

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. September 2003 (25.09.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/078629 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/11, 15/82

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/02735

(22) Internationales Anmeldedatum: 17. März 2003 (17.03.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität: 102 12 892.8 20. März 2002 (20.03.2002) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE/DE]; Carl-Bosch-Strasse 38, 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): KOCK, Michael [DE/DE]; Am Leutbusch 12, 67105 Schifferstadt (DE). BAUER, Jörg [DE/DE]; Friedrich-Profit-Str. 56, 67063 Ludwigshafen (DE).

(74) Anwalt: DÖRPER, Thomas; BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 03/078629 A1

(54) Title: CONSTRUCTS AND METHODS FOR THE REGULATION OF GENE EXPRESSION

(54) Bezeichnung: KONSTRUKTE UND VERFAHREN ZUR REGULATION DER GENEXPRESSION

(57) Abstract: The invention relates to constructs and methods for the regulation of gene expression of at least two endogenous target genes by introduction of an at least partly double-stranded ribonucleic acid molecule into a eukaryotic cell or a eukaryotic organism, whereby the ribonucleic acid molecule comprises at least two ribonucleotide sequence sections which are homologous with various genes of the eukaryotic cell.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Konstrukte und Verfahren zur Regulation der Genexpression von mindestens zwei endogenen Zielgenen durch Einbringen eines zumindest teilweise doppelsträngigen Ribonukleinsäuremoleküls in eine eukaryotische Zelle oder einen eukaryotischen Organismus, wobei das Ribonukleinsäuremolekül mindestens zwei Ribonukleotidsequenzabschnitte umfasst, die zu verschiedenen Genen der eukaryotischen Zelle homolog sind.

Konstrukte und Verfahren zur Regulation der Genexpression

Beschreibung

5.

Die vorliegende Erfindung betrifft Konstrukte und Verfahren zur Regulation der Genexpression von mindestens zwei endogenen Zielgenen durch Einbringen eines zumindest teilweise doppelsträngigen Ribonukleinsäuremoleküls in eine eukaryotische Zelle oder einen 10 eukaryotischen Organismus, wobei das Ribonukleinsäuremolekül mindestens zwei Ribonukleotidsequenzabschnitte umfasst, die zu verschiedenen Genen der eukaryotischen Zelle homolog sind.

Die gezielte Inhibition der Genexpression definierter Gene ist 15 eine der am meisten beforschten Technologie der Biotechnologie. Die Expression von antisense-RNA ist dabei der am häufigsten verwendet Ansatz und vielfach beschrieben (u.a. EP-A1 0 458 367; EP-A1 0 140 308; van der Krol AR et al. (1988) BioTechniques 6(10):658-676; de Lange P et al. (1995) Curr Top Microbiol Immunol 197:57-75). Antisense-RNA vermittelte Ansätze haben jedoch den Nachteil, dass stöchiometrische Mengen der antisense-RNA erforderlich sind, um eine wirksame Inhibition der Ziel-mRNA zu bewirken. Weitere Probleme stehen im Zusammenhang mit dem Einbringen der antisense-RNA in ausreichenden Mengen in die Zellen und 25 mit der Labilität der antisense-RNA. Ansätze basierend auf antisense-RNA sind daher meist ineffizient.

Ein weiterer Ansatz zur Genregulation ist die "Co-Suppression" und meint die Verminderung der Expression eines endogenen Zielgens durch transgene Expression einer sense-RNA dieses Zielgens 30 (EP-A1 0 465 572). Der Co-Suppression liegen vermutlich mehr als ein Mechanismus zugrunde. Nachteilig ist die mangelnde Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit des Verfahrens. In manchen Fällen erfolgt Suppression, während in anderen Fällen - bedingt durch 35 die Expression der sense-RNA - die erwartete Überexpression erfolgt. Auch ist der erhaltene Phänotyp oft nicht stabil. Die Anwendung der Co-Suppression ist im wesentlichen auf Pflanzen beschränkt.

40 Verschiedene Abwandlungen der Verfahren basierend auf antisense-RNA oder Cosuppression sind bekannt. So beschreibt WO 93/23551 ein Verfahren zur Inhibition mehrerer Gene durch Expression einer chimären antisense-RNA oder sense-RNA. Das Verfahren kann die üblichen mit antisense-RNA oder sense-RNA verbundenen Probleme nicht lösen und bleibt ineffizient.
45

WO 98/36083 und WO 99/15682 beschreiben die Regulation der Genexpression mittels viraler Expressionssysteme ("virus induced gene

silencing" VIGS).

WO 99/32619 und WO 99/53050 beschreiben Verfahren zur Inhibition einzelner Zielgene unter Verwendung einer RNA mit doppelsträngiger Struktur, wobei das Zielgen und die Region der RNA Duplex zumindest eine teilweise Identität aufweisen (siehe auch: Montgomery MK et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:15502- 15507; Sharp PA (1999) Genes & Development 13(2):139-141; Fire A et al. (1998) Nature 391:806-11). Das Verfahren wird heute auch als "RNA-Interference" (RNAi) bezeichnet und hat in Mechanismus und Wirkung Ähnlichkeiten mit dem oben erwähnten VIGS Verfahren.

Die beschriebenen Verfahren, insbesondere das RNAi-Verfahren, lösen zwar einige Probleme im Zusammenhang mit der Verminderung einzelner Zielgene. Für andere Probleme, insbesondere für die parallele Suppression mehrerer Zielgene, konnte jedoch bislang keine befriedigende Lösung bereit gestellt werden. Zahlreiche Ansätze in der Biotechnologie erfordern nicht nur die Verminderung eines einzelnen Zielgens, sondern mehrerer Zielgene, wie beispielsweise verschiedener Gene eines oder verschiedener Stoffwechselwege oder ganzer Genfamilien. Bislang war dies nur mit erheblichen Arbeits- und Zeitaufwand zu realisieren. Die Ansätze erforderten oft die individuelle Regulation der einzelnen Zielgene durch sukzessive Transformation beispielsweise mit verschiedenen Expressionskonstrukten, die jeweils für eine antisense RNA eines Zielgens kodierten. Neben dem erheblichen Arbeits- und Zeitaufwand, besteht dabei der Nachteil, dass für viele Systeme und Organismen nur eine beschränkte Anzahl von Selektionsmarkern, geeigneten Promotoren etc. zur Verfügung steht, was multiple Transformationen erheblich erschwert und beispielsweise die Deletion der Marker nach der Transformation und Selektion erfordert. Die mehrfache Verwendung eines Promotors hat oft unerwünschte Folgen, wie beispielsweise ein epigenetisches Gene-Silencing. Hierbei kommt es infolge der mehrfach verwendeten Kontrollsequenzen zu einer Inaktivierung derselben, vergleichbar der oben beschriebenen Cosuppression.

Es stellte sich also die Aufgabe, neue Verfahren bereit zu stellen, die eine effiziente Verminderung der Expression mindestens zweier endogener Zielgene in einer eukaryotischen Zelle oder einem eukaryotischen Organismus ermöglichen. Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung gelöst.

Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft Verfahren zur Verminderung der Expression von mindestens zwei verschiedenen, endogenen Zielgenen in einer eukaryotischen Zelle oder einem eukaryotischen Organismus durch Einbringen eines zumindest teilweise doppelsträngigen Ribonukleinsäuremoleküls in besagte eukaryotische

Zelle oder besagten eukaryotischen Organismus, wobei das doppelsträngige Ribonukleinsäuremolekül umfasst

a) mindestens zwei "sense"-Ribonukleotidsequenzen, wobei jeweils
5 mindestens eine dieser "sense"-Ribonukleotidsequenzen im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines jeden der besagten endogenen Zielgene und

10 b) "antisense"-Ribonukleotidsequenzen, die zu besagten "sense"-Ribonukleotidsequenzen unter a) im wesentlichen komplementären sind.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung umfasst ein zumindest teilweise doppelsträngiges Ribonukleinsäuremolekül, wobei das doppelsträngige Ribonukleinsäuremolekül umfasst

a) mindestens zwei "sense"-Ribonukleotidsequenzen, wobei jeweils mindestens eine dieser "sense"-Ribonukleotidsequenzen im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines endogenen Zielgens, wobei jedoch nicht alle "sense"-Ribonukleotidsequenzen zu dem "sense"-RNA-Transkript eines einzigen endogenen Zielgens identisch sind, und
25

b) "antisense"-Ribonukleotidsequenzen, die zu besagten "sense"-Ribonukleotidsequenzen unter a) im wesentlichen komplementären sind.

30 Umfasst ist ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen doppelsträngiges Ribonukleinsäuremolekül in einem der erfindungsgemäßen Verfahren.

Die vorliegende Erfindung löst die oben geschilderten Probleme
35 und ermöglicht eine schnelle, besonders effiziente Methode zur Regulation der Expression verschiedener Zielgene. Insbesondere ergeben sich folgende Vorteile:

a) Transgene Organismen oder Zellen, in denen mehr als ein Zielgen inhibiert wird, können in einer einzigen Transformation erzeugt werden.
40

b) Die Transkriptionsrate für jeden Ribonukleotidsequenz der dsRNA ist gleich. Dadurch werden multiple Phänotypen durch unterschiedliche Expressionshöhen verhindert, wie sie bei individueller Expression separater Ribonukleotidsequenzen - beispielsweise durch den unterschiedlichen Ort der Insertion
45

in das Genom - oft entstehen. Dieser Vorteil gewährleistet eine gleichbleibend hohe Inhibition aller Zielgene und vermindert dramatisch die erforderlichen Selektionsschritte zu Generierung eines Organismus, bei dem alle Zielgene effizient supprimiert werden.

c) Ein ökonomischer Umgang mit Kontrollelementen wie Promotoren und Selektionsmarkern wird ermöglicht. Zudem erübrigen sich Probleme, wie sie bei der mehrfachen Verwendung eines bestimmten Kontrollelementes, insbesondere eines Promoters, entstehen können ("epigenic gene silencing").

d) Eine Segregation der einzelnen Ribonukleotidsequenzen bei nachfolgenden Züchtungs- und Kreuzungsschritten, wie sie bei der Verwendung mehrerer Expressionskonstrukte zwangsläufig entsteht, wird verhindert. Dadurch wird die nachfolgende Züchtung stabiler Linien erheblich erleichtert und beschleunigt.

e) Organismen mit komplexen beispielsweise polyploide Genomen, wie beispielsweise manche Pflanzen, sind einer effizienten Gensuppression zugänglich. Aufgrund der zahlreichen Kopien für einzelne Gene sind diese Organismen klassischen Verfahren der Mutagenese und Selektion nicht zugänglich.

Überraschenderweise konnte bei dem erfindungsgemäßen Verfahren keine störende Interferenz zwischen den einzelnen Ribonukleotidsequenzabschnitte untereinander beobachtet werden.

"Endogenes Zielgen einer eukaryotischen Zelle oder eines eukaryotischen Organismus" meint jede Nukleinsäuresequenz in einer eukaryotischen Zelle, einem eukaryotischen Organismus oder einem Teil, Organ, Gewebe, Samen etc. desselben, die zur Transkription befähigt ist. Dabei kann es sich um natürlicherweise vorkommende oder aber künstlich eingeführte Sequenzen (wie beispielsweise transgene Sequenzen) handeln, wobei natürlicherweise vorkommende Sequenzen bevorzugt sind. Natürlicherweise vorkommende Sequenzen sind bevorzugt und umfassen sowohl die eigenen Sequenzen der eukaryotischen Zelle oder des eukaryotischen Organismus als auch Gene von Pathogenen, die in der eukaryotischen Zelle oder dem eukaryotischen Organismus nach einem Befall durch ein Pathogen präsent sind. Das Zielgen kann in der chromosomal DNA oder der DNA der Organellen (wie beispielsweise der Plastiden z.B. Chloroplasten etc.) lokalisiert sein oder aber sich extrachromosomal in der Zelle befinden. Die natürlicherweise vorkommenden, eigenen Sequenzen des eukaryotischen Organismus umfassen bevorzugt Gene desselben, die stabil im Genom vorliegen, wobei das Genom die Ge-

samttheit der genetischen Information meint und sowohl die chromosomal als auch die plastidäre DNA umfasst. Bevorzugt ist das endogene Zielgen ein natürlicherweise in der chromosomal DNA vor kommendes Gen. Bevorzugt sind Gene deren verminderte Expression 5 zu einem veränderten Phänotyp führt.

"Verminderung" oder "vermindern" der Expression eines Zielgens ist im Zusammenhang weit auszulegen und umfasst die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Expression des Zielgens oder der von ihm abgeleiteten RNA, mRNA, rRNA, tRNA und/oder des dadurch kodierten Proteinproduktes in einer Zelle oder einem Organismus oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zelle oder Samen. Eine Verminderung im Sinne 10 der Erfindung umfasst die mengenmässige Verringerung einer vom Zielgen exprimierten RNA, mRNA, rRNA, tRNA und/oder des dadurch kodierten Proteinproduktes bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen derselben. Dabei wird die Expression einer bestimmten RNA, mRNA, rRNA, tRNA und/oder des dadurch kodierten 15 Proteinproduktes in einer Zelle oder einem Organismus im Vergleich zu der selben Zelle oder Organismus, die dem Verfahren nicht unterworfen wurden, bevorzugt um mehr als 50%, besonders bevorzugt um mehr als 80%, ganz besonders bevorzugt um mehr als 90%, am meisten bevorzugt mehr als 95% vermindert. Dabei kann die 20 Verminderung durch den Fachmann geläufigen Verfahren ermittelt werden. So kann die Verminderung der Proteinmenge beispielsweise durch immunologischen Nachweis des Proteins bestimmt werden. Weiterhin können biochemische Techniken wie Northern-Hybridisierung, "nuclease protection assay", Reverse Transkription (quantitative RT-PCR), ELISA ("enzyme linked immunosorbent assay"), Western-Blotting, Radioimmunoassay (RIA) oder andere Immunoassays sowie "fluorescence activated cell analysis" (FACS) eingesetzt 25 werden. Je nach Art des verminderten Proteinproduktes kann auch dess Aktivität oder der Einfluss auf den Phänotyp des Organismus 30 oder der Zelle ermittelt werden.

"Proteinmenge" meinte die Menge eines bestimmten Polypeptides in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment.

40 "Verminderung" der Proteinmenge meint die mengenmässige Verminderung der Menge eines bestimmten Polypeptides in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment - beispielsweise durch das erfundungsgemäße Verfahren - im Vergleich 45 zu dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den dieses Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonst gleichen Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter, Nährstoffzufuhr

etc.). Der Verminderung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 10% oder mindestens 20%, besonders bevorzugt um mindestens 40% oder 60%, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70% oder 80%, am meisten bevorzugt um mindestens 90% oder 95%. Verfahren zur Bestimmung der Proteinmenge sind dem Fachmann bekannt.

Beispielhaft seien zu nennen: Das Mikro-Biuret Verfahren (Goa J (1953) Scand J Clin Lab Invest 5:218-222), die Folin-Ciocalteu-Methode (Lowry OH et al. (1951) J Biol Chem 193:265-275) oder die Messung der Adsorption von CBB G-250 (Bradford MM (1976) Analyt Biochem 72:248-254).

"Verschieden" meint in Bezug auf zwei endogene Zielgene bevorzugt, dass die von den beiden endogenen Zielgenen transkribierte RNA oder mRNA nicht identisch ist. Bevorzugt ist die Homologie der von den beiden endogenen Zielgenen transkribierte RNA oder mRNA geringer als 90%, bevorzugt geringer als 80%, besonders bevorzugt geringer als 70%, ganz besonders bevorzugt geringer als 60%, am meisten bevorzugt geringer als 50% über jeweils die gesamte Länge der transkribierten RNA oder mRNA.

"Zumindest teilweise doppelsträngiges Ribonukleinsäuremolekül" (infolge dsRNA) meint Ribonukleinsäuremolekül, die ganz oder teilweise doppelsträngig sind. Bevorzugt ist die Ribonukleinsäuresequenz überwiegend vollständig doppelsträngig. "Überwiegend vollständig doppelsträngig" meint, dass zumindest 50%, bevorzugt 70%, besonders bevorzugt 80%, ganz besonders bevorzugt 90% der in dem Molekül vorhandenen Basen in Paarung mit einer anderen Base der dsRNA vorliegen oder - entsprechend der Sequenz der dsRNA und den Basenpaarregeln sowie gegebenenfalls einer RNA-Sekundärstrukturvoraussage mittels eines geeigneten Computeralgorithmus - zumindest theoretisch vorliegen können.

"Im wesentlichen identisch" meint, dass eine "sense"-Ribonukleotidsequenz der dsRNA auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der Sequenz des "sense"-RNA-Transkriptes eines endogenen Zielgens aufweisen kann. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Basen einer Nukleinsäuresequenz. Bevorzugt beträgt die Homologie zwischen einer "sense"-Ribonukleotidsequenz einer dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkript eines endogenen Zielgens mindestens 60 %, bevorzugt mindestens 70 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 %, am meisten bevorzugt 95%. Die Sequenzen können auch identisch mit der korrespondierenden Sequenz des Zielgens sein. Eine 100%ige Sequenzidentität zwischen der "sense"-Ribonukleotidsequenz der dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-Stranges der Transkriptes eines endogenen Gens ist bevorzugt, wenn gleich

nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der Expression des endogenen Gens zu bewirken. Einzelne Mutationen werden toleriert. Das Verfahren ist demnach tolerant gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise auch möglich mit einer einzigen dsRNA, die ausgehend von einer bestimmten endogenen Gen generiert wurde, die Expression weiterer homologer endogener Gene des gleichen Organismus oder aber auch die Expression homologer endogener Gene in anderen verwandten Arten zu unterdrücken.

Unter Homologie wird das Maß der Übereinstimmung zwischen zwei Nukleotid-, Ribonukleotid- oder Proteinsequenzen verstanden, die bevorzugt durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus 15 GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389ff) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

20 Gap Weight: 50 Length Weight: 3

Average Match: 10 Average Mismatch: 0

Dem Fachmann ist bewusst, dass wenn die Homologie zwischen DNA 25 (z.B. Genen) und RNA bestimmt wird, Thymin (T) in der DNA Sequenz als äquivalent zu Uracil (U) in der RNA Sequenz betrachtet wird.

"Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines endogenen Zielgens" meint Fragmente einer RNA oder mRNA transkribiert von einem endogenen Zielgen. Dabei hat besagtes Teil bevorzugt eine Sequenzlänge von mindestens 10 Basen, bevorzugt mindestens 25 Basen, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen. Umfasst ist auch die vollständige 35 transkribierte RNA oder mRNA.

Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines Transkriptes, bevorzugt der mRNA, eines endogenen 40 Zielgenes zu hybridisieren (z.B. in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h oder unter anderen Standardhybridisierungsbedingungen).

"Standardhybridisierungsbedingungen" ist breit zu verstehen und 45 meint weniger stringente als auch - bevorzugt - stringente Hybridisierungsbedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in

Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57) oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben.

5

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrittes ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und - bevorzugt - solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0,2X SSC 10 bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7.0). Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrittes von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr 22°C, bis zu - bevorzugt - stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben werden. Beide Parameter, 15 Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50% Formamid wird 20 die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt. Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrift sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungbedingungen zum Beispiel aus nachfolgenden Bedingungen ausgewählt sein:

- a) 4X SSC bei 65°C,
- b) 6X SSC bei 45°C,
- c) 6X SSC, 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA bei 68°C,
- f) 50% Formamid, 4X SSC bei 42°C,
- h) 2X oder 4X SSC bei 50°C (schwach stringente Bedingung),
- i) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42°C (schwach stringente Bedingung).

35

(2) Waschschrifte können zum Beispiel aus nachfolgenden Bedingungen ausgewählt sein:

- a) 0,015 M NaCl/0,0015 M Natriumcitrat/0,1% SDS bei 50°C.
- b) 0,1X SSC bei 65°C.
- c) 0,1X SSC, 0,5% SDS bei 68°C.
- d) 0,1X SSC, 0,5% SDS, 50% Formamid bei 42°C.
- e) 0,2X SSC, 0,1% SDS bei 42°C.
- f) 2X SSC bei 65°C (schwach stringente Bedingung).

45

"Im wesentlichen komplementär" meint, dass die "antisense"-Ribonukleotidsequenzen der dsRNA auch Insertionen, Deletionen sowie

einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement der "sense"-Ribonukleotidsequenzen aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100% zwischen den "antisense"-Ribonukleotidsequenzen und dem Komplement der "sense"-Ribonukleotidsequenzen. Komplement meint dabei - in der dem Fachmann geläufigen Weise - den entsprechend den Basenpaarregeln abgeleiteten Gegenstrang.

10 Die doppelsträngige Struktur der dsRNA kann ausgehend von einem einzigen, ganz oder teilweise selbstkomplementären RNA-Strang (bei dem die oben erwähnten "sense"- und "antisense"-Ribonukleotidsequenzen der dsRNA alle kovalent miteinander verbunden sind) oder ausgehend von zwei RNA-Strängen (indem die oben erwähnten "sense"- und "antisense"-Ribonukleotidsequenzen der dsRNA auf separate Stränge vorliegen), die zueinander ganz oder teilweise komplementär sind, gebildet werden. Bei zwei separaten Strängen können beispielsweise alle "sense"-Ribonukleotidsequenzen auf dem einen und alle "antisense"-Ribonukleotidsequenzen auf dem anderen Strang vorliegen. Die Sequenzen können aber auch anders auf die beiden Stränge verteilt sein. Die Ausbildung der doppelsträngigen Struktur kann *in vitro* aber auch *in vivo* - beispielsweise in der eukaryotischen Zelle selber - erfolgen. Bevorzugt liegt die dsRNA in Form eines einzigen, selbstkomplementären RNA-Stranges vor.

15 20 25 30 35 40 45

Die einzelnen "sense"-Ribonukleotidsequenzen können mit den korrespondierenden, im wesentlichen komplementären "antisense"-Ribonukleotidsequenzen eine doppelsträngige RNA-Struktur mittels Basenpaarung ausbilden und bilden eine Untereinheit der dsRNA.

Im Falle eines selbstkomplementären Stranges ergeben sich verschiedene Möglichkeiten für die Primärstruktur der dsRNA. Nachfolgend aufgeführte sind beispielhaft, jedoch nicht einschränkend zu verstehen:

a) Es können zunächst die "sense"-Ribonukleotidsequenzen (S) der einzelnen Untereinheiten aneinander gefügt werden, wodrauf dann eine Aneinanderreihung der im wesentlichen komplementären "antisense"-Ribonukleotidsequenzen (AS) folgt. Die Anzahl der Einheiten n ist größer oder gleich zwei. Es entsteht eine Struktur mit einer einzelnen Haarnadel. Die Primärstruktur der dsRNA kann dabei schematisch beispielsweise wie folgt aussehen:

5'-S(1)-S(2)-.....-S(n)-AS(n)-....-AS(2)-AS(1)-3'

Die bevorzugte Sekundärstruktur ist in Fig. 2-A wiedergegeben.

5 b) Es können zunächst die "sense"-Ribonukleotidsequenz (S) und die im wesentlichen komplementäre "antisense"-Ribonukleotidsequenz (AS) der ersten Untereinheiten aneinander gefügt werden, wodrauf dann die Aneinanderreihung von "sense"- und "antisense"-Ribonukleotidsequenzen der weiteren Untereinheiten folgt. Die Anzahl der Einheiten n ist größer oder gleich 10 zwei. Es entsteht eine Struktur mit mehreren Haarnadeln. Die Primärstruktur der dsRNA kann dabei schematisch beispielsweise wie folgt aussehen:

5' -S(1)-AS(1)-S(2)-AS(2).....-S(n)-AS(n)-3'

15

Die bevorzugte Sekundärstruktur ist in Fig. 2-B wiedergegeben.

Ist die dsRNA - bevorzugt - in der Lage eine Haarnadelstruktur auszubilden, so entspricht der Stamm der Haarnadel dem doppelsträngige Anteil der dsRNA, der durch Basenpaarung zwischen auf dem gleich RNA-Moleküle lokalisierten "sense"- und "antisense"-Ribonukleotidsequenz gebildet wird. Dabei werden "sense"- und "antisense"-Ribonukleotidsequenzen bevorzugt durch einen "Linker" verbunden. Der "Linker" ist bevorzugt ein Intron, das aus der 25 dsRNA herausgespleißt werden kann. Selbstkomplementären dsRNA-Strukturen ausgehend von einem einzelnen RNA-Molekül sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression eines Konstruktes erfordern und die komplementären RNA-Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis umfassen.

30

Bei der Verwendung eines Linkers (I) - bevorzugt eines Intron - seien nachfolgende schematische Primärstrukturen für die dsRNA beispielhaft genannt:

35 c) Dies ist eine bevorzugte Variante von a), bei der an der Stelle der Haarnadelschlaufe ein Linker (I) - bevorzugt ein Intron - insertiert wird:

5' -S(1)-S(2)-.....-S(n)-I-AS(n)-....-AS(2)-AS(1)-3'

40

Die bevorzugte Sekundärstruktur ist in Fig. 2-C wiedergegeben.

45 d) Dies ist eine bevorzugte Variante von b), bei der an der Stelle der jeder Haarnadelschlaufe ein Linker (I) - bevorzugt ein Intron - insertiert wird:

5' -S(1)-I-AS(1)-S(2)-I-AS(2).....-S(n)-I-AS(n)-3'

5 Die bevorzugte Sekundärstruktur ist in Fig. 2-D wiedergegeben.

Die dsRNA Moleküle sind jedoch auch ohne den Linker funktionell. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die letzten ca. 10 Nukleotide der terminalen Untereinheit S(n) in diesem Fall nicht 10 mehr korrekt paaren. In diesem Fall ist die Länge für diese Untereinheit um 10 Nukleotide zu ergänzen. Der Linker ist bevorzugt ein Intron, besonders bevorzugt ein Intron in sense-Orientierung. Bevorzugt handelt es sich um ein Intron eines pflanzlichen Gens. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien zu nennen: Das In-15 tron 3 der Alkoholdehydrogenase 1 (Adh1) aus Mais (GenBank Acc.-No.: AF044293; GI: 2828164), das Intron 4 der beta-Conglycinin alpha Untereinheit aus Soja (GenBank Acc.-No.: AB051865); eines der Introns des rbcS-3A Gens für Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase (RBC) kleine Untereinheit aus Erbse (GenBank Acc.-No.: X04333). Diese und weitere geeignete Introns sind dem Fachmann bekannt (McCullough AJ & Schuler MA (1997) Nuc Acids Res 25:1071-1077). Für die Anwendung in dem erfindungsgemäßen Verfahren wird das Intron bevorzugt in Kombination mit Spleißakzeptor- und Spleißdonorsequenzen eingesetzt, die ein späteres Heraus-25 spleißen aus der dsRNA ermöglichen. Diese Spleißsequenzen können die flankierenden Sequenzen des Intron selber sein, oder aber auch durch dentsprechende Sequenzen der übrigen dsRNA bereitgestellt werden.

30 Jede der einzelnen "sense"-Ribonukleotidsequenzen der dsRNA ist im wesentlichen identisch zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines endogenen Zielgens. Dabei sind jedoch nicht alle "sense"-Ribonukleotidsequenzen zu dem "sense"-RNA-Transkript eines einzigen endogenen Zielgens identisch, sondern die jeweils maximale Identität von mindestens zwei 35 der "sense"-Ribonukleotidsequenzen besteht zu den "sense"-RNA-Transkripten von unterschiedlichen endogenen Zielgenen. Dabei beträgt die Homologie zwischen den Transkripten der beiden endogenen Zielgene unter 90%, bevorzugt unter 80%, besonders bevorzugt unter 70%, ganz besonders bevorzugt unter 60%, am meisten bevorzugt unter 50%.

Mindestens zwei der in der erfindungsgemäßen dsRNA umfassten einzelnen "sense"-Ribonukleotidsequenzen sind unterschiedlich. Unterschiedlich bedeutet zum einen, dass die Zielgene zu deren Transkripten sie die jeweils maximale Identität aufweisen, nicht identisch sind. Bevorzugt vermindert mindestens eine Untereinheit

12

der dsRNA die Expression eines anderen Gens als mindestens eine andere Untereinheit. Unterschiedlich kann zum anderen auch heißen, dass die "sense"-Ribonukleotidsequenzen der Untereinheiten selber im wesentlichen nicht identisch sind und bevorzugt eine 5 Homologie zu einander unter 60%, besonders bevorzugt unter 50% ganz besonders bevorzugt unter 40% aufweisen. Die dsRNA kann in einer weiteren Ausführungsform mehrerer Kopien einer Untereinheit enthalten. Weiterhin kann die dsRNA auch mehrere verschiedene Untereinheiten enthalten, die aber gegen das gleiche endogene Ziel- 10 gens gerichtet sind und deren "sense"-Ribonukleotidsequenzen beispielsweise im wesentlichen identisch sind zu unterschiedlichen Teilen des "sense"-RNA-Transkriptes des besagten endogenen Ziel- gens.

15 Dabei kann jede der einzelnen "sense"-Ribonukleotidsequenzen auch zu dem Transkript mehrerer endogener Zielgene im wesentlichen identisch sein. Dies ist besonders dann der Fall, wenn die Ziel- gene über ähnliche Sequenzabschnitte verfügen, wie es beispielsweise bei Mitgliedern von Genfamilien (z.B. Speicherproteinen) 20 der Fall ist. Dies ist eine besonders vorteilhafte Anwendungs- form, da - bei entsprechender Wahl der Ribonukleotidsequenz einer Untereinheit - besagte Untereinheit die Expression von mehr als einem Zielgen vermindern kann.

25 Vorzugsweise wird die Sequenz der dsRNA so gewählt, dass die angestrebte dsRNA Struktur nach Ausbildung der Duplex - im Vergleich zu anderen möglichen Faltungsvarianten der Primärstruktur der dsRNA - die jeweils geringste freie Energie hat. Dies kann beispielsweise durch Vermeidung von Sequenzduplikationen etc. ge- 30 währleistet werden. Die spezifische Sekundärstruktur kann beispielsweise mit geeigneten Computerprogrammen vorausgesagt und optimiert werden (z.B. FOLDRNA; Zuker and Stiegler (1981) Nucleic Acids Res 9(1):133-48).

35 Jede Untereinheit der dsRNA hat in einer bevorzugten Ausführungs- form eine Länge von mindestens 20 Basenpaaren, bevorzugt mindestens 50 Basenpaaren, besonders bevorzugt mindestens 100 Basen- paare, ganz besonders bevorzugt mindestens 250 Basenpaare.

40 In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform hat jede Einheit eine Länge eine ganzzahligen Vielfachen von 21 oder 22 Basenpaaren, also beispielsweise 21, 22, 42, 43, 44, 63, 64, 65, 66, 84, 85, 86, 87, 88, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 126, 127, 128, 129, 131, 132, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 168, 169, 170, 45 171, 172, 173, 174, 175, 176, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 oder 220 Basenpaare, bevorzugt 21, 22, 42, 44, 63, 66, 84, 88,

13

105, 110, 126, 132, 147, 154, 168, 176, 189, 198, 210 oder 220 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt 21, 42, 63, 84, 105, 126, 147, 168, 189 oder 210 Basenpaare, am meisten bevorzugt 180 oder 210 Basenpaare.

5

Die "sense"- und/oder "antisense"-Ribonukleotidsequenzen der einzelnen Untereinheiten können direkt oder aber durch einen "Spacer" (SP; Abstandshalter) miteinander verbunden und/oder flankiert sein. Die einzelnen "Spacer" (SP) können dabei identisch 10 oder aber auch unterschiedlich sein. Der "Spacer" genügt dabei bevorzugt den gleichen Längenanforderungen wie sie oben für die Länge der Untereinheiten selber gegeben sind. Der "Spacer" kann eine doppelstränge Struktur ausbilden, kann aber auch - beispielsweise in Form einer Blase - in ungepaarter Formation bestehen, d.h. die Basen in Strang und Gegenstrang müssen nicht zwingerweise komplementär sein. Bevorzugte Ausführungsformen sind 15 zum Beispiel durch nachfolgende Primärstrukturen beschrieben:

e) Dies ist eine bevorzugte Variante von c):

20

5' SP-S(1)-SP-S(2)-SP-...-S(n)-AS(n)-SP-...-AS(2)-SP-AS(1)-SP-3'

Die bevorzugte Sekundärstruktur ist in Fig. 3-A wiedergegeben.

25

Der "Spacer" kann weitere Funktionselemente umfassen. Beispielsweise jedoch nicht einschränkend sind zu nennen:

30

i) Sequenzen kodierend für eine von einem Ribozym als Substrat erkannten Erkennungssequenz (RE). Beispielsweise kann die dsRNA nachfolgende lineare Struktur vor der Faltung einnehmen:

5'-S(1)-(RE)-S(2)-...-S(n)-AS(n)-...-AS(2)-(RE)-AS(1)-3'

35

Die bevorzugte Sekundärstruktur ist in Fig. 3-B wiedergegeben. Das entsprechende Ribozym (R) kann separat exprimiert werden kann aber auch auf der dsRNA selber kodiert sein. Dabei ist die Sequenz kodierend für ein Ribozym bevorzugt so angeordnet, dass sie im gefalteten dsRNA Molekül einer Sequenz gegenüber liegt, die für dieses Ribozym als Substrat fungieren kann. Beispielsweise kann die dsRNA nachfolgende lineare Struktur vor der Faltung einnehmen:

45

5'-S(1)-(R)(RE)-S(2)-...-S(n)-AS(n)-...-AS(2)-(R)(RE)-AS(1)-3'

Die bevorzugte Sekundärstruktur ist in Fig. 3-C wiedergegeben. Durch die genannten Ausführungsformen werden nach Transkription die einzelnen Untereinheiten durch Wirkung des Ribozym voneinander getrennt. Diese Trennung ist vorteilhaft, jedoch nicht zwingend erforderlich. Entsprechend nutzbare Ribozyme und Erkennungssequenzen sind dem Fachmann bekannt.

Ribozyme meint katalytische RNA-Moleküle. Ribozyme können an jede beliebige Ziel-RNA angepasst werden und spalten das Phosphodiester-Gerüst an spezifischen Positionen, wodurch die Ziel-RNA funktionell deaktiviert wird (Tanner NK (1999) FEMS Microbiol Rev 23(3):257-275). Das Ribozym wird dadurch nicht selber modifiziert, sondern ist in der Lage, weitere Ziel-RNA-Moleküle analog zu spalten, wodurch es die Eigenschaften eines Enzyms erhält. Der Einbau von Ribozymsequenzen in "antisense"-RNAs verleiht eben diesen "antisense"-RNAs diese enzymähnliche, RNA-spaltende Eigenschaft und steigert so deren Effizienz bei der Inaktivierung der Ziel-RNA. Die Herstellung und Verwendung entsprechender Ribozym-"antisense"-RNA-Moleküle ist beispielsweise beschrieben bei Haselhoff et al. (1988) Nature 334: 585-591. Auf diese Art können Ribozyme (z.B. "Hammerhead"-Ribozyme; Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591) verwendet werden, um die eines bestimmte RNA katalytisch zu spalten. Verfahren zur Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine sind beschrieben in (EP 0 291 533, EP 0 321 201, EP 0 360 257). In pflanzlichen Zellen ist eine Ribozym-Expression ebenfalls beschrieben (Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338). Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei "Steinecke P, Ribozymes, Methods in Cell Biology 50, Galbraith et al. eds, Academic Press, Inc. (1995), S.449-460" beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al. (1992) Plant Mol Biol. 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al. (1994) Mol Gen Genet. 242(6):653-657). Beispielsweise können Derivate der Tetrahymena L-19 IVS RNA konstruiert werden, die komplementäre Bereiche zu der mRNA des zu den Spacersequenzen aufweisen (siehe auch US 4,987,071 und US 5,116,742). Alternativ können solche Ribozyme auch über einen Selektionsprozess aus einer Bibliothek diverser Ribozyme identifiziert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418).

45 ii) Sequenzen kodierend für Erkennungssequenzen für RNAAse
Der "Spacer" kann Erkennungssequenzen für RNAsen, bevorzugt sequenzspezifische RNAsen wie beispielsweise RNase III ent-

halten. RNase III schneidet am Motiv 5'-AGNN-3, wenn vier dieser Motive in einer Schleife vorhanden sind (Nagel R & Ares M (2000) RNA 6:1142-1156). Die RNase kann eine pflanze-neigene RNase sein, oder - wie beispielsweise für bakterielle RNase III Proteine - auch transgen exprimiert werden.

5 iii) Sequenzen kodierend für Intronspleißsignale (IS). Dabei sind die Spleißdonor und Spleißakzeptorsequenzen bevorzugt so lokalisiert, dass jeweils die Untereinheit als Intron heraus-
10 gespleißt wird. Intronspleißsignale sind in Meritt et al. (1997) Plant Journal 12:937-943 oder in Egoavil et al. (1997) Plant Journal 12:971-980 beschrieben.

Die dsRNA bzw. ihre Vorläufermoleküle können auf verschiedene dem 15 Fachmann geläufige Weise in einen Organismus oder eine Zelle eingebracht werden. "Einbringen" ist breit zu verstehen und umfasst im Rahmen der Erfindung alle Verfahren, die dazu geeignet eine dsRNA bzw. ihre Vorläufermoleküle, direkt oder indirekt, in einen Organismus oder eine Zelle, Kompartiment, Gewebe, Organ oder Sa-
20 men desselben einzuführen oder dort zu generieren. Die Einbrin- gung kann zu einer vorübergehenden (transienten) Präsenz einer dsRNA führen oder aber auch zu einer dauerhaften (stabilen). Um- fasst sind Verfahren der direkten Transfektion oder Transforma-
25 tion der Zelle mit der als auch die Transformation oder Trans- fektion der Zelle mit Expressionskassetten, die befähigt sind, die der dsRNA zugrundeliegenden Ribonukleinsäuresequenzen in der Zelle zu exprimieren (infolge dsRNA-Expressionssystem). Die Ex- pression der dsRNA kann transient oder - beispielsweise nach In- tegration in das Genom des Organismus - permanent erfolgen. Die
30 Duplex-Bildung der dsRNA kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden.

Die dsRNA wird in einer Menge eingeführt, die zumindest eine Ko-
pie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10,
35 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter Verminderung der Expression der Zielgene bewirken. Da dsRNA eine außerordentlich gute Mobilität innerhalb eines Organismus hat, ist es nicht zwingend erforderlich die dsRNA in jede Zelle des Organismus zu applizieren. Es ist ausreichend, die dsRNA in eine
40 oder wenige Zellen einzubringen oder zu exprimieren, wobei die erfindungsgemäße Wirkung dann auch in anderen Zellen des gleichen Organismus erzielt werden kann.

Eine dsRNA - beispielsweise zur Verwendung in einer direkten
45 Transformation oder Transfektion - kann kann in vivo oder in vi- tro, durch enzymatische, molekularbiologische oder chemisch-syn- synthetische Verfahren synthetisiert werden. Dazu können eukaryoti-

sche, prokaryotische oder Bakteriophagen RNA Polymerasen (wie z.B. T3-, T7- oder SP6 RNA-Polymerase) verwendet werden. Entsprechende Verfahren zu in vitro Expression von RNA sind beschrieben (WO 97/32016; US 5,593,874; US 5,698,425, US 5,712,135, US 5,789,214, US 5,804,693). Eine chemisch oder enzymatisch in vitro synthetisierte dsRNA kann vor der Einführung in eine Zelle, Gewebe oder Organismus aus dem Reaktionsgemisch beispielsweise durch Extraktion, Präzipitation, Elektrophorese, Chromatographie oder Kombinationen dieser Verfahren ganz oder teilweise aufgereiht werden. Die dsRNA kann direkt in die Zelle eingeführt werden (beispielsweise durch Partikelbeschuß oder Mikroinjektion) oder aber extrazellulär (z.B. in den interstitial Raum, das Gefäßsystem, das Verdauungssystem o.ä.) appliziert werden. Auch eine Applikation beispielsweise von dsRNA exprimierenden Organismen in Form von Nahrung ist denkbar. Es ist bekannt, dass dsRNA eine gute Zellgängigkeit und ausreichende Stabilität hat. Durch die hohe Wirksamkeit der dsRNA sind auch wenige Moleküle ausreichend, um eine gute Wirkung im Sinne der Erfindung zu erzielen.

Es können ferner Modifikationen sowohl des Zucker-Phosphat-Gerüsts als auch der Nukleoside in der dsRNA vorliegen. Beispielsweise können die Phosphodiesterbindungender der RNA dahingehend modifiziert sein, dass sie zumindest ein Stickstoff oder Schwefel-Heteroatom umfassen. Basen können dahingehend modifiziert werden, dass die Aktivität beispielsweise von Adenosindeaminase eingeschränkt wird. Die dsRNA kann enzymatisch oder ganz oder teilweise chemisch-synthetisch hergestellt werden.

Bevorzugt wird die dsRNA jedoch ausgehend von entsprechenden Expressionssystemen in der Zelle exprimiert. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft besagte dsRNA-Expressionssysteme. Wird die dsRNA als ein einzelner, selbstkomplementären RNA-Strang exprimiert, so umfasst das Expressionssystem eine Expressionskassette mit einer für den selbstkomplementären RNA-Strang kodierenden DNA Sequenz in funktioneller Verknüpfung mit einem Promotor, der geeignet ist, die Expression in der jeweiligen eukaryotischen Zelle zu gewährleisten. Optional kann die Expressionskassette weitere funktionelle Elemente wie beispielsweise Transkriptionsterminatoren und/oder Polyadenylierungssignale umfassen. Derartige Expressionskassetten sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Wird die dsRNA in Form von zwei separaten Strängen exprimiert, die zueinander ganz oder teilweise komplementär sind, so umfasst das Expressionssystem zwei Expressionskassetten, wobei jeder der beiden Stränge in funktioneller Verknüpfung mit einem Promotor steht, der geeignet ist, die Expression in der jeweiligen euka-

ryotischen Zelle zu gewährleisten. Optional können die Expressionskassetten weitere funktionelle Elemente wie beispielsweise Transkriptionsterminatoren und/oder Polyadenylierungssignale umfassen. Die Kombination der beiden Expressionskassetten zu dem 5 erfindungsgemäßen Expressionssystem kann auf verschiedene dem Fachmann geläufige Art geschehen. Beispielhaft seien zu nennen:

- a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der Expressionskassetten für beide RNA-Stränge umfasst,
- 10 b) Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei jeweils ein Vektor für jeweils einen der beiden Stränge der dsRNA kodiert.
- 15 c) Kreuzung von zwei Pflanzen, die mit jeweils einem Vektor transformiert wurden, wobei jeweils ein Vektor für jeweils einen der beiden Stränge der dsRNA kodiert.

Es ist auch möglich, dass eine Expressionskassette einzusetzen, 20 bei der die für die dsRNA kodierende DNA-Sequenz zwischen zwei Promotoren mit entgegengerichteter Transkriptionsrichtung lokalisiert ist und so von beiden Seiten transkribiert wird.

Expressionskassette meint chimäre DNA-Moleküle in denen eine für 25 das dsRNA-Molekül (bzw. für einen der Stränge desselben) kodierende Nukleinsäuresequenz mit mindestens einem genetischen Kontrollelement (beispielsweise einem Promotor, Enhancer, Silencer, Splice-Donor oder -Akzeptor, Polyadenylierungssignal) derart verknüpft ist, dass die Transkription des dsRNA-Moleküls (bzw. eines 30 der Stränge desselben) in der eukaryotischen Zelle oder Organismus gewährleistet ist. Entsprechend vorteilhafte Konstruktionen sind weiter unten beschrieben. Eine Polyadenylierung ist möglich, jedoch nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initierung einer Translation vorhanden sein.

35 Soll das Expressionskonstrukt in eine Pflanze eingeführt und die dsRNA in plantae erzeugt werden, so sind pflanzenspezifische genetische Kontrollelemente (beispielsweise pflanzenspezifische Promotoren) bevorzugt. Die dsRNA kann jedoch auch in anderen Organismen oder in vitro erzeugt und dann in die Pflanze eingebracht werden.

Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promoters mit der zu transkribierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator und/oder Polyadenylierungssignalen derart, dass jedes der regulativen Elemente seine

18

Funktion bei der Transkription der Nukleinsäuresequenz, je nach Anordnung der Nukleinsäuresequenzen erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die zu transkribierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die zu transkribierende Nukleinsäuresequenz so hinter dem Promotor lokalisiert, das der Transkriptionsstart identisch ist mit dem gewünschten Beginn der dsRNA.

Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung einer Expressionskassette kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben sind.

30

Unter einer Expressionskassette sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen zum Beispiel eine Nukleinsäuresequenz kodierend für eines dsRNA derart hinter einen endogenen Promotor platziert werden, dass der gleiche Effekt auftritt. Beide Ansätze führen zu Expressionskassetten im Sinne der Erfindung.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden, solange sie die Expression in dem Zielorganismus gewährleisten. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Es können weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine Expression in weiteren Eukaryoten oder in Prokaryoten, wie zum Beispiel *E.coli* Bakterien ermöglichen.

5

Die in den erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren enthaltenen Nukleinsäuresequenzen können mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen neben einem Promoter funktionell verknüpft sein. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassette haben. Genetische Kontrollsequenzen modifizieren zum Beispiel die Transkription in prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen Expressionskassetten 5'-stromaufwärts von der jeweiligen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz einen pflanzenspezifischen Promoter und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von Genen. Es ist gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktion bei der Regulation der Genexpression spielen können. Kontrollsequenzen umfassen ferner Polyadenylierungssignale sowie Terminatorsequenzen.

Die Expressionskassette kann vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte transgene Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Methoden wie die cre/lox-Technologie erlauben eine gewebespezifische, unter Umständen induzierbare Entfernung der Expressionskassette aus dem Genom des Wirtsorganismus (Sauer B 45 (1998) Methods. 14(4):381-92). Hier werden bestimmte flankierende

Sequenzen dem Zielgen angefügt (lox-Sequenzen), die später eine Entfernung mittels der cre-Rekombinase ermöglichen.

Bevorzugt kann die Expressionskassette, bestehend aus einer Ver-
5 knüpfung von Promoter und zu transkribierender Nukleinsäurese-
quenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Bei-
spiel Transformation - nach einem der unten beschriebenen Verfah-
ren - in die eukaryotische Zelle oder Organismus eingebracht wer-
den. Die nachfolgende Expression kann transient sein oder aber
10 auch - bevorzugt - stabil nach Insertion (beispielsweise unter
Verwendung von Selektionsmarkern) der Expressionskassetten in das
Genom erfolgen. Bevorzugt wird das dsRNA-Expressionssystem stabil
in das Genom - beispielsweise die chromosomale DNA oder die DNA
der Organellen (z.B. der Plastiden, Mitochondrien etc.) - einer
15 Zelle integriert.

Die Einführung einer erfindungsgemäßen transgenen Expressions-
kassette in einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile
bzw. Samen desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zel-
20 len, Gewebe, Organe, Teile oder Samen) kann vorteilhaft unter
Verwendung von Vektoren realisiert werden, in denen die transge-
nen Expressionskassetten enthalten sind. Vektoren können bei-
spielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobakte-
rien sein. Die transgenen Expressionskassetten können in den Vek-
25 tor (bevorzugt ein Plasmidvektor) über eine geeignete Restrikti-
onsschnittstelle insertiert werden. Der entstandene Vektor wird
zunächst in E.coli eingeführt. Korrekt transformierte E.coli wer-
den selektioniert, gezüchtet und der rekombinante Vektor mit dem
Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und
30 Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu über-
prüfen. Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine stabile Integra-
tion der Expressionskassette in das Wirtsgenom ermöglichen.

Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer
35 transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die entspre-
chende DNA (z.B. der Expressionsvektor) oder RNA in die entspre-
chende Wirtszelle eingebracht wird. Für diesen Vorgang, der als
Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet
wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (Keown et
40 al. (1990) Methods in Enzymology 185:527-537). So kann die DNA
oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bom-
bardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt wer-
den. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylen-
glycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion
45 in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Protopla-
stenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells,
Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist

eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilang et al. (1991) Gene 100:247-250; Scheid et al. 5 (1991) Mol Genet 228:104-112; Guerche et al. (1987) Plant Science 52:111-116; Neuhouse et al. (1987) Theor Appl Genet 75:30-36; Klein et al. (1987) Nature 327:70-73; Howell et al. 10 (1980) Science 208:1265; Horsch et al. (1985) Science 227:1229-1231; DeBlock et al. (1989) Plant Physiology 91:694-701; Methods for Plant Molecular Biology (Weissbach and Weissbach, eds.) Academic Press Inc. (1988); and Methods in Plant Molecular 15 Biology (Schuler and Zielinski, eds.) Academic Press Inc. (1989)).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Zellen, die eines der erfindungsgemäßen dsRNA Moleküle, Expressionssysteme, Expressionskassetten oder Expressionsvektoren enthalten. Die Zelle kann von einem Organismus abgeleitet oder in diesem enthalten sein, meint aber auch einzellige Organismen wie Mikroorganismen. Die 20 Zelle kann prokaryotisch oder eukaryotischer Natur sein. Wobei das erfindungsgemäße Verfahren auf eukaryotische Organismen angewendet wird. Dennoch können prokaryotische Organismen die erfindungsgemäßen Expressionssysteme beispielsweise zum Zwecke der dsRNA-Produktion enthalten. Auch können prokaryotische Organismen, beispielsweise Agrobakterien, vorteilhaft als Vehikel für 25 die Transformation beispielsweise pflanzlicher Organismen eingesetzt werden.

Bevorzugte Prokaryoten sind vor allem Bakterien wie Bakterien der 30 Gattung Escherichia, Corynebacterium, Bacillus, Clostridium, Proionibacterium, Butyrivibrio, Eubacterium, Lactobacillus, Erwinia, Agrobacterium, Flavobacterium, Alcaligenes, Phaeodactylum, Colpidium, Mortierella, Entomophthora, Mucor, Cryptecodinium oder Cyanobakterien zum Beispiel der Gattung Synechocystis. Bevorzugt sind vor allem Mikroorganismen, welche zur Infektion von 35 Pflanzen und damit zur Übertragung der erfindungsgemäßen Konstrukte befähigt sind. Bevorzugte Mikroorganismen sind solche aus der Gattung Agrobacterium und insbesondere der Art Agrobacterium tumefaciens.

40 Eukaryotische Zellen und Organismen umfasst pflanzliche und tierische, nicht-menschliche Organismen und/oder Zellen sowie eukaryotische Mikroorganismen wie beispielsweise Hefen, Algen oder Pilze. Eine entsprechender transgener Organismus kann beispielsweise durch Einführung der entsprechenden Expressionssysteme in 45

eine Zygote, Stammzelle, Protoplast oder eine andere geeignete von dem Organismus abgeleitete Zelle hergestellt werden.

"Tierische Organismus" meint nicht-menschliche Vertebraten oder

5 Invertebraten. Bevorzugte Vertebraten umfassen beispielsweise Fischarten, nicht-menschliche Säugetiere wie Rind, Pferd, Schaf, Ziege, Maus, Ratte oder Schwein, sowie Vögel wie Huhn oder Gans. Bevorzugte tierische Zellen umfassen CHO, COS, HEK293 Zellen. Invertebraten umfassen Nematoden oder andere Würmer sowie Insekten.

10 Invertebraten umfassen Insektenzellen wie Drosophila S2 und Spodoptera Sf9 oder Sf21 Zellen.

Bevorzugt sind ferner Nematoden, die in der Lage sind Tiere oder Menschen zu befallen, wie solche der Gattungen Ancylostoma, Ascaris, Bunostomum, Caenorhabditis, Capillaria, Chabertia, Cooperia, Dictyocaulus, Haemonchus, Heterakis, Nematodirus, Oesophagostomum, Ostertagia, Oxyuris, Parascaris, Strongylus, Toxascaris, Trichuris, Trichostrongylus, Tfchchonema, Toxocara oder Uncinaria. Ferner bevorzugt sind solche, die in der Lage sind pflanzliche Organismen zu befallen wie beispielsweise Bursaphelenchus, Criconemella, Diiylenchus, Ditylenchus, Globodera, Heliocotylenchus, Heterodera, Longidorus, Melodoigyne, Nacobbus, Paratylenchus, Pratylenchus, Radopholus, Rotelychnus, Tylenchus oder Xiphinema. Bevorzugte Insekten umfassen solche der Gattungen Coleoptera, Diptera, Lepidoptera und Homoptera.

Bevorzugte Pilze sind Aspergillus, Trichoderma, Ashbya, Neurospora, Fusarium, Beauveria oder weitere in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze. Besonders bevorzugt ist der filamentöse Hemiascomycet Ashbya gossypii.

Bevorzugte Hefen sind Candida, Saccharomyces, Hansenula oder Pichia, besonders bevorzugt sind Saccharomyces cerevisiae oder Pichia pastoris (ATCC Accession No. 201178).

Als transgene Organismen bevorzugt sind vor allem pflanzliche Organismen. "Pflanzlicher Organismus" umfasst jeden Organismus, der zur Photosynthese befähigt ist, sowie die von diesem abgeleitete Zellen, Gewebe, Teile oder Vermehrungsgut (wie Samen oder Früchte). Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches. Einjährige, mehrjährige, monocotyledone und dicotyledone Pflanzen sowie Gymnospermen sind bevorzugt. Eingeschlossen sind reife Pflanze, Saatgut, Sprosse und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut (zum Beispiel Knollen, Samen oder Früchte) und Kulturen, zum Beispiel Zell- oder Kalluskulturen.

23

Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

- 5 "Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut, Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und andere
- 10 Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen, sowie alle anderen Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.
- 15 "Pflanze" umfasst alle einjährige und mehrjährige, monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen und schließt beispielhaft jedoch nicht einschränkend solche der Gattungen Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solarium, Petunia, Digitalis, Majorana, Ciahorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, Panieum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Zea, Avena, Hordeum, Secale, Triticum, Sorghum, Picea und Populus ein.

Bevorzugt sind Pflanzen nachfolgender Pflanzenfamilien: Amaranthaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Carophyllaceae, Chenopodiaceae, 30 Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Labiate, Leguminosae, Papilioideae, Liliaceae, Linaceae, Malvaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Solanacea, Sterculiaceae, Tetragoniacea, Theaceae, Umbelliferae.

35 Bevorzugte monokotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel der Familie der Gramineae wie Alfalfa, Reis, Mais, Weizen oder andere Getreidearten wie Gerste, Hirse, Roggen, Triticale oder Hafer sowie dem Zuckerrohr sowie alle Arten von Gräsern.

40 Die Erfindung wird ganz besonders bevorzugt aus dikotyledone pflanzliche Organismen angewendet. Bevorzugte dikotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den dikotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel

24

- Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes oder Calendula und andere mehr,
- Compositae, besonders die Gattung Lactuca, ganz besonders die Art sativa (Salat) und andere mehr,
- Cruciferae, besonders die Gattung Brassica, ganz besonders die Arten napus (Raps), campestris (Rübe), oleracea cv Tastie (Kohl), oleracea cv Snowball Y (Blumenkohl) und oleracea cv Emperor (Broccoli) und weitere Kohlarten; und der Gattung Arabidopsis, ganz besonders die Art thaliana sowie Kresse oder Canova und andere mehr,
- Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini und andere mehr,
- Leguminosae besonders die Gattung Glycine, ganz besonders die Art max (Sojabohne) Soja sowie Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss und andere mehr
- Rubiaceae, bevorzugt der Unterklasse Lamiidae wie beispielsweise Coffea arabica oder Coffea liberica (Kaffestrauch) und andere mehr,
- Solanaceae besonders die Gattung Lycopersicon, ganz besonders die Art esculentum (Tomate) und die Gattung Solanum, ganz besonders die Art tuberosum (Kartoffel) und melongena (Aubergine) sowie Tabak oder Paprika und andere mehr,
- Sterculiaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Theobroma cacao (Kakastrauch) und andere mehr,
- Theaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Camellia sinensis oder Thea sinensis (Teestrauch) und andere mehr,
- Umbelliferae, besonders die Gattung Daucus (ganz besonders die Art carota (Karotte)) und Apium (ganz besonders die Art graveolens dulce (Selarie)) und andere mehr; und die Gattung Capsicum, ganz besonders die Art annum (Pfeffer) und andere mehr,
- sowie Lein, Soya, Baumwolle, Hanf, Flachs, Gurke, Spinat, Möhre, Zuckerrübe und den verschiedenen Baum-, Nuss- und Weinarten, insbesondere Banane und Kiwi.
- Umfasst sind ferner Schmuckpflanzen, Nutz- oder Zierbäume, Blumen, Schnittblumen, Sträucher oder Rasen. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen Angiospermen, Bryophyten wie zum

Beispiel Hepaticae (Leberblümchen) und Musci (Moose); Pteridophyten wie Farne, Schachtelhalm und Lycopoden; Gymnospermen wie Koniferen, Cycaden, Ginkgo und Gnetalen, die Familien der Rosaceae wie Rose, Ericaceae wie Rhododendrons und Azaleen, Euphorbiaceae wie Weihnachtssterne und Kroton, Caryophyllaceae wie Nelken, Solanaceae wie Petunien, Gesneriaceae wie das Usambaraveilchen, Balsaminaceae wie das Springkraut, Orchidaceae wie Orchideen, Iridaceae wie Gladiolen, Iris, Freesie und Krokus, Compositae wie Ringelblume, Geraniaceae wie Geranien, Liliaceae wie der Drachenbaum, Moraceae wie Ficus, Araceae wie Philodendron und andere mehr.

Pflanzliche Organismen im Sinne der Erfindung sind weiterhin weitere photosynthetisch aktive befähigte Organismen, wie zum Beispiel Algen, Cyanobakterien sowie Moose. Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung Haematococcus, Phaedactylum tricornatum, Volvox oder Dunaliella. Insbesondere bevorzugt ist Synechocystis.

20 Am meisten bevorzugt sind

- a) Pflanzen, die zur Ölproduktion geeignet sind, wie beispielsweise Raps, Sonnenblume, Sesam, Färberdistel (*Carthamus tinctorius*), Ölbaum, Soja, Mais, Erdnuß, Rizinus, Ölpalme, Weizen, Kakastrauch oder verschiedene Nussarten wie beispielsweise Walnuss, Kokosnuß oder Mandel. Unter diesen wieder besonders bevorzugt sind dikotyledonen Pflanzen, insbesondere Raps, Soja und Sonnenblume.
- 25 b) Pflanzen, die der Stärkeproduktion dienen, wie beispielsweise Mais, Weizen oder Kartoffel.
- c) Pflanzen, die als Nahrungs- und/oder Futtermittel und/oder Nutzpflanze genutzt werden und bei denen eine Resistenz gg. Pathogene vorteilhaft wäre, wie beispielsweise Gerste, Roggen, Reis, Kartoffel, Baumwolle, Flachs, Lein.
- 35 d) Pflanzen, die zur Produktion von Feinchemikalien wie beispielsweise Vitaminen und/oder Carotinoiden dienen können, wie beispielsweise Raps.

Die in den Verfahren verwendeten Organismen werden je nach Wirtsorganismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. gezüchtet. Mikroorganismen werden in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle meist in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle meist in Form von organischen Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat, Spurenelemente

26

wie Eisen-, Mangan-, Magnesiumsalze und gegebenenfalls Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0°C und 100°C, bevorzugt zwischen 10°C bis 60°C unter Sauerstoffbegasung angezogen. Dabei kann der pH der Nährflüssigkeit auf einen festen Wert gehalten werden,
5 das heißt während der Anzucht reguliert werden oder nicht. Die Anzucht kann batch weise, semi batch weise oder kontinuierlich erfolgen. Nährstoffe können zu Beginn der Fermentation vorgelegt oder semikontinuierlich oder kontinuierlich nach gefüttert werden.

10

Nachfolgende Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens seien beispielhaft jedoch nicht einschränkend zu nennen:

I. Pflanzenbiotechnologie

15

Bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren im Rahmen der Pflanzenbiotechnologie zur Erzeugung von Pflanzen mit vorteilhaften Eigenschaften eingesetzt. So kann Eignung der Pflanzen oder deren Samen als Nahrungs- oder Futtermittel verbessert werden,
20 beispielsweise über eine Veränderung der Zusammensetzungen und/oder des Gehalt an Metaboliten, insbesondere Proteinen, Ölen, Vitaminen und/oder Stärke. Auch können Wachstumsrate, Ertrag oder die Resistenz gegen biotische oder abiotische Stressfaktoren erhöht werden. Nachfolgende Anwendungen im Bereich der Pflanzenbiotechnologie sind insbesondere vorteilhaft. Die angegebenen möglichen Zielgene sind beispielhaft jedoch nicht einschränkend zu verstehen:

1. Verbesserter Schutz gegen abiotische Stressfaktoren (Hitze,
30 Kälte, Trockenheit, erhöhte Feuchtigkeit, Umweltgifte, UV-Strahlung). Bevorzugt werden Gene in ihrer Expression vermindert, die am Stressreaktionen beteiligt sind.
2. Modifikation der Zusammensetzung und/oder des Gehaltes an Fettsäuren, Lipiden oder Ölen
35

Eine Veränderung des Fettsäuregehalten oder der Fettsäurezusammensetzung, vorzugsweise in einer Ölfrucht wie Raps oder Sonnenblume, kann beispielsweise erreicht werden durch Verminderung der Genexpression von Genen der Fettsäurebiosynthese vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Genen kodierend für Acetyltransacylasen, Acyltransportproteinen ("acyl carrier protein"), Desaturasen wie Stearyldesaturasen oder mikrosomale Δ12-Desaturasen insbesondere Fad2-1 Gene,
40 Malonyltransacylase, β-Ketoacyl-ACP-synthetasen, 3-Keto-ACP-reduktasen, Enoyl-ACP-hydrasen, Thioesterasen wie Acyl-ACP-thioesterases, Enoyl-ACP-reduktasen. Verschiedene weitere vor-

teilhafte Ansätze zur Modifizierung der Lipidzusammensetzung sind beschrieben (Shure M et al. (1983) Cell 35:225-233; Preiss et al. (1987) Tailoring Genes for Crop Improvement (Bruening et al., eds.), Plenum Press, S.133-152; Gupta et al. (1988) Plant Mol Biol. 10:215-224; Olive et al. (1989) Plant Mol Biol 12:525-538; Bhattacharyya et al. (1990) Cell 60:155-122; Dunwell JM (2000) J Exp Botany 51Spec No:487-96; Brar DS et al. (1996) Biotech Genet Eng Rev 13:167-79; Kishore GM und Somerville CR (1993) Curr Opin Biotech 4(2):152-8). Bevorzugt sind insbesondere Fad2 Gene (z.B. beschrieben durch Genbank Acc.-Nr.: AF124360 (*Brassica carinata*), AF042841 (*Brassica rapa*), L26296 (*Arabidopsis thaliana*), A65102 (*Corylus avellana*)). Weitere vorteilhafte Gene und Verfahren zur Modifikation des Lipidgehaltes sind beispielsweise beschrieben in US 5,530,192 und WO 94/18337. Ein erhöhter Lipidgehalt kann auch erreicht werden durch Verminderung des Stärkegehalts beispielsweise infolge verminderter Expression von Enzymen des Kohlenhydratstoffwechsels (z.B. ADP-Glucosepyrophosphorylasen).

20

3. Modifikation der Kohlenhydratzusammensetzung

Eine Modifikation der Kohlenhydratzusammensetzung kann beispielsweise erreicht werden durch Verminderung der Genexpression von Genen des Kohlenhydratstoffwechsels oder der Kohlenhydratbiosynthese, beispielsweise der Biosynthese von Amylose, Pektinen, Cellulose oder Zellwandkohlenhydraten. Dadurch kann eine Vielzahl zellulärer Prozesse (Reifung, Haltestigkeit, Stärkezusammensetzung oder -gehalt etc.) in vorteilhafter Weise beeinflusst werden. Als Zielgene seien beispielhaft jedoch nicht einschränkend zu nennen Phosphorylasen, Stärkesynthetasen, Q-Enzyme, Sucrose-6-phosphatsynthetasen, Sucrose-6-phosphatphosphatasen, ADP-Glucosepyrophosphorylasen, Branching-Enzyme, Debranching-Enzyme sowie diverse Amylasen. Die entsprechenden Gene sind beschrieben (Dunwell JM (2000) J Exp Botany 51Spec No:487-96; Brar DS et al. (1996) Biotech Genet Eng Rev 13:167-79; Kishore GM und Somerville CR (1993) Curr Opin Biotech 4(2):152-8). Vorteilhafte Gene zur Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels - insbesondere der Stärkebiosynthese - sind beschrieben in WO 92/11375, WO 92/11376, US 5, 365,016 und WO 95/07355.

4. Veränderung der Farbe oder Pigmentierung

Veränderung der Farbe oder Pigmentierung vorzugsweise von Zierpflanzen kann beispielsweise erreicht werden durch Verminderung der Genexpression von Genen der Flavonoid-Biosynt-

hese wie beispielsweise Chalconsynthasen, Chalconisomerasen, Phenylalaninammonialyasen, Dehydrokaempferol (flavone) hydroxylasen wie Flavanon-3-hydroxylasen oder Flavanon-2-hydroxylasen, Dihydroflavonolreduktasen, Dihydroflavanol-2-hydroxylasen, Flavonoid-3'-hydroxylasen, Flavonoid-5'-hydroxylasen, Flavonoidglycosyltransferasen (z.B. Glucosyltransferasen wie UDPG:Flavonoid-3-O-glucosyltransferasen, UDPG:Flavonol-7-O-glucosyltransferasen oder Rhamnosyltransferasen), Flavonoidmethyltransferasen (wie z.B. SAM:Anthocyanidin-3-(p-coumaroyl)-rutinosid-5-glucosid-3',5'-O-methyltransferasen) und Flavonoidacyltransferasen (Hahlbrock (1981) Biochemistry of Plants, Vol.7, Conn (Ed.); Weiring and de Vlaeminig (1984) "Petunia", KC Sink (Ed.), Springer-Verlag, New York). Geeignet sind insbesondere die in EP-A1 522 880 beschriebenen Sequenzen.

5. Verminderung des Gehaltes von Speicherproteinen

Die Verminderung der Genexpression von Genen kodierend für Speicherproteine (infolge SP) hat zahlreiche Vorteile, wie beispielsweise Verminderung des allergenen Potentials oder Veränderung in der Zusammensetzung oder Menge anderer Metabolite. Speicherproteine sind u.a. beschrieben in EP-A 0 591 530, WO 87/47731, WO 98/26064, EP-A 0 620 281; Kohno-Murase J et al. (1994) Plant Mol Biol 26(4): 1115-1124.

SP dienen zur Speicherung von Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel, die für das schnelle heterotrophe Wachstum bei Keimung von Samen oder Pollen benötigt werden. Sie haben meist keine enzymatische Aktivität. SP werden dabei nur im Embryo während der Samenentwicklung synthetisiert und akkumulieren dabei zum einen in Proteinspeichervakuolen (PSV) von unterschiedlich differenzierten Zellen im Embryo bzw. Endosperm.

"Speicherprotein" meint allgemein ein Protein, das mindestens eine der nachfolgenden wesentlichen Eigenschaften aufweist:

- i) Speicherproteine werden im wesentlichen nur im Embryo während der Samenentwicklung exprimiert. "Im wesentlichen" bedeutet dabei, dass in dem besagten Stadium mindestens 50%, bevorzugt mindestens 70%, ganz besonders bevorzugt mindestens 90%, am meisten bevorzugt mindestens 95% der Gesamtexpression über die Lebensdauer einer Pflanze hinweg stattfindet.

ii) Speicherproteine werden während der Keimung des Samen wieder abgebaut. Dabei beträgt der Abbau während der Keimung mindestens 20%, bevorzugt mindestens 50%, ganz besonders bevorzugt mindestens 80%.

5

iii) Speicherproteine machen einen wesentlichen Anteil am Gesamtproteingehalt des nicht-keimenden Samens aus. Bevorzugt macht das Speicherprotein in dem nicht-keimenden Samen der Wildtyp-Pflanze mehr als 5 Gew.% des Gesamtproteins aus, besonders bevorzugt mindestens 10 Gew.%, ganz besonders bevorzugt mindestens 20 Gew.%, am meisten bevorzugt mindestens 30 Gew.-%.

10

Bevorzugt weisen Speicherproteine 2 oder alle der oben genannten wesentlichen Eigenschaften i), ii) oder iii) auf.

15

Speicherproteine können in Untergruppen entsprechend weiterer charakteristischer Eigenschaften, wie beispielsweise ihrem Sedimentationskoeffizienten oder der Löslichkeit in verschiedenen Lösungen (Wasser, Salzlösung, Alkohol) aufgeteilt werden. Die Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten kann in der dem Fachmann vertrauten Weise mittels Ultrazentrifugation durchgeführt werden (z.B. beschrieben bei Correia JJ (2000) Methods in Enzymology 321:81-100).

20

Insgesamt können vier grosse Genfamilien für Speicherproteine aufgrund ihrer Sequenzen zugeordnet werden: 2S-Albumine (Napin-ähnlich), 7S-Globuline (Phaseolin-ähnlich), 11S/12S-Globuline (Legumin-/Cruciferin-ähnlich) und die Zein-Prolamine.

25

2S Albumine sind weit verbreitet in Samen von Dikotyledonen, einschliesslich wichtiger kommerzieller Pflanzenfamilien wie Fabaceae (z.B. Sojabohne), Brassicaceae (z.B. Raps), Euphorbiaceae (z.B. Rizinus) oder Asteraceae (z.B. Sonnenblume). 2S Albumine sind kompakte globuläre Proteine mit konservierten Cysteinresten, die oft Heterodimere bilden.

30

7S-Globuline liegen in trimerer Form vor und enthalten keine Cysteinreste. Nach ihrer Synthese werden sie wie die 2S-Albumine in kleinere Fragmente gespalten und glykosyliert. Trotz Unterschiede in der Polypeptidgrösse sind die verschiedenen 7S-Globuline hoch konserviert und gehen vermutlich wie die 2S-Albumine auf einen gemeinsamen Vorläuferprotein zurück. Die 7S-Globuline sind nur in geringen Mengen in Monokotyledonen vorhanden. In Dikotyledonen ist ihr Anteil immer kleiner verglichen mit den 11S/12S-Globulinen.

35

40

45

30

11S/12S-Globuline stellen neben den 2S-Albuminen die Hauptfraktion der Speicherproteine in Dikotyledonen. Die hohe Ähnlichkeit der verschiedenen 11S-Globuline aus verschiedenen Pflanzengattungen lassen wiederum auf einen gemeinsamen Vorläuferprotein in der Evolution schliessen.

Bevorzugt ist das Speicherprotein ausgewählt aus den Klassen der 2S-Albumine (Napin-ähnlich), 7S-Globuline (Phaseolin-ähnlich), 11S/12S-Globuline (Legumin-/Cruciferin-ähnlich) oder Zein-Prolamine.

Besonders bevorzugte 2S-Albumine umfassen

- i) 2S-Albumine aus *Arabidopsis*, ganz besonders bevorzugt die 2S-Albumine mit der SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 8, am meisten bevorzugt die durch die Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5 oder 7 kodierten Proteine,
- ii) 2S-Albumine aus Arten der Gattung *Brassica*, wie beispielsweise *Brassica napus*, *Brassica nigra*, *Brassica juncea*, *Brassica oleracea* oder *Sinapis alba*, ganz besonders bevorzugt die 2S-Albumine mit der SEQ ID NO: 32, 34, 36, 38, 40, 46 oder 48, am meisten bevorzugt die durch die Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO: 31, 33, 35, 37, 39, 45 oder 47 kodierten Proteine,
- iii) 2S-Albumine aus *Soja*, ganz besonders bevorzugt die 2S-Albumine mit der SEQ ID NO: 42 oder 44, am meisten bevorzugt die durch die Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO: 41 oder 43 kodierten Proteine,
- iv) 2S-Albumine aus Sonnenblume (*Helianthus annus*), ganz besonders bevorzugt die 2S-Albumine mit der SEQ ID NO: 50 oder 52, am meisten bevorzugt die durch die Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO: 49 oder 51 kodierten Proteine,

sowie die entsprechenden Homologen und funktionellen Äquivalente zu i) oder ii) oder iii) oder iv) aus identischen oder anderen Pflanzenarten, insbesondere Raps, Sonnenblume, Lein, Sesam, Färberdistel, Ölbaum, Soja oder verschiedene Nussarten. Funktionelle Äquivalente zeichnen sich bevorzugt neben den oben genannten wesentlichen Eigenschaften durch charakteristische Eigenschaften wie einen 2S-Sedimentationskoeffizienten und/oder durch eine Löslichkeit in Wasser aus.

31

Funktionelle Äquivalente der 2S-Albumine haben in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform eine Homologie von mindestens 60%, bevorzugt mindestens 80%, ganz besonders bevorzugt mindestens 90%, am meisten bevorzugt mindestens 95% zu einer der Proteinsequenzen mit der SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50 oder 52 wobei die Homologie sich bevorzugt über eine Länge von mindestens 30 Aminosäuren, bevorzugt mindestens 50 Aminosäuren besonders bevorzugt über 100 Aminosäuren, am meisten bevorzugt über die gesamte Länge der jeweiligen Proteine erstreckt, und weisen die gleichen wesentlichen Eigenschaften eines Speicherproteins und - bevorzugt- die charakteristischen Eigenschaften eines 2S-Speicherproteins auf.

Besonders bevorzugte 7S-Globuline umfassen solche aus Arabidopsis oder Soja, ganz besonders bevorzugt die Proteine mit der SEQ ID NO: 94 oder 96, am meisten bevorzugt die durch die Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO: 93 oder 95 kodierten Proteine. Funktionelle Äquivalente zeichnen sich bevorzugt neben den oben genannten wesentlichen Eigenschaften durch charakteristische Eigenschaften wie einen 7S-Sedimentationskoeffizienten und/oder durch eine Löslichkeit in Salzlösung aus. Als weitere charakteristische Eigenschaft können 7S-Globuline keine Cysteinreste enthalten.

Funktionelle Äquivalente der 7S-Globuline haben in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform eine Homologie von mindestens 60%, bevorzugt mindestens 80%, ganz besonders bevorzugt mindestens 90%, am meisten bevorzugt mindestens 95% zu einer der Proteinsequenzen mit der SEQ ID NO: 94 oder 96 wobei die Homologie sich bevorzugt über eine Länge von mindestens 30 Aminosäuren, bevorzugt mindestens 50 Aminosäuren besonders bevorzugt über 100 Aminosäuren, am meisten bevorzugt über die gesamte Länge der jeweiligen Proteine erstreckt, und weisen die gleichen wesentlichen Eigenschaften eines Speicherproteins und - bevorzugt- die charakteristischen Eigenschaften eines 7S-Speicherproteins auf.

Besonders bevorzugte 11S/12S-Globuline umfassen bevorzugt 11S-Globuline aus Raps, Soja und Arabidopsis insbesondere

- i) 11S-Globuline aus Raps mit der SEQ ID NO: 10, 12, 14, 16 oder 18, am meisten bevorzugt die durch die Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO: 9, 11, 13, 15 oder 17 kodierten Proteine,

ii) die 11S-Globuline aus Soja mit der SEQ ID NO: 20, 22, 24, 26 oder 28, am meisten bevorzugt die durch die Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO: 19, 21, 23, 25 oder 27 kodierten Proteine,

5

iii) die 11S-Globuline aus Arabidopsis thaliana mit der SEQ ID NO: 60, 62, 64, 66, 68 oder 70 am meisten bevorzugt die durch die Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO: 59, 61, 63, 65, 67 oder 69 kodierten Proteine,

10

sowie die entsprechenden Homologen und funktionellen Äquivalente aus anderen Pflanzenarten, insbesondere Raps, Sonnenblume, Lein, Sesam, Färberdistel, Ölbaum, Soja oder verschiedene Nussarten, wie beispielsweise das Sonnenblume 11S Speicherprotein (SEQ ID NO: 30), insbesondere das durch die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 29 kodierte Protein. Funktionelle Äquivalente zeichnen sich bevorzugt neben den oben genannten wesentlichen Eigenschaften durch charakteristische Eigenschaften wie einen 11S- oder 12S-Sedimentationskoeffizienten und/oder durch eine Löslichkeit in Salzlösung (PBS; phosphatgepufferte Salzlösung) und/oder eine schlechte Löslichkeit in Wasser aus.

25

Funktionelle Äquivalente der 11S- oder 12S Albumine haben in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform eine Homologie von mindestens 60%, bevorzugt mindestens 80%, ganz besonders bevorzugt mindestens 90%, am meisten bevorzugt mindestens 95% zu einer der Proteinsequenzen mit der SEQ ID NO: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 60, 62, 64, 66, 68 oder 70

30

wobei die Homologie sich bevorzugt über eine Länge von mindestens 30 Aminosäuren, bevorzugt mindestens 50 Aminosäuren besonders bevorzugt über 100 Aminosäuren, am meisten bevorzugt über die gesamte Länge der jeweiligen Proteine erstreckt, und weisen die gleichen wesentlichen Eigenschaften eines Speicherproteins und - bevorzugt- die charakteristischen Eigenschaften eines 11S- oder 12S-Speicherproteins auf.

40

Besonders bevorzugte Zein-Prolamine umfassen bevorzugt solche aus monokotyledonen Pflanzen, insbesondere Mais, Rais, Hafer, Gerste oder Weizen. Ganz besonders bevorzugt sind die Mais Zein-Prolamine beschrieben durch SEQ ID NO: 98, 100, 102 oder 104 - insbesondere die durch SEQ ID NO 97, 99, 101 oder 103 kodierten Protein -, das Reis Prolamin gemäß SEQ ID NO: 106 - insbesondere das durch SEQ ID NO 105 kodierte Protein -, das Hafer Prolamin gemäß SEQ ID NO: 108 - insbesondere das durch SEQ ID NO 107 kodierte Proteine-, das Gerste Prolamin gemäß SEQ ID NO: 110 und/oder 111 - insbesondere das durch SEQ ID

45

33

NO 109 kodierte Protein - und das das Weizen Prolamin gemäß SEQ ID NO: 113 - insbesondere das durch SEQ ID NO 112 kodierte Protein. Funktionelle Äquivalente zeichnen sich bevorzugt durch eine Löslichkeit in 70%iger ethanolischer Lösung und eine schlechte Löslichkeit in Wasser oder Salzlösung aus.

Funktionelle Äquivalente der Zein-Prolamine haben in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform eine Homologie von mindestens 60%, bevorzugt mindestens 80%, ganz besonders bevorzugt mindestens 90%, am meisten bevorzugt mindestens 95% zu einer der Proteinsequenzen mit der SEQ ID NO: 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 111 oder 113 wobei die Homologie sich bevorzugt über eine Länge von mindestens 30 Aminosäuren, bevorzugt mindestens 50 Aminosäuren besonders bevorzugt über 100 Aminosäuren, am meisten bevorzugt über die gesamte Länge der jeweiligen Proteine erstreckt, und weisen die gleichen wesentlichen Eigenschaften eines Speicherproteins und - bevorzugt - die charakteristischen Eigenschaften eines Zein-Prolamine auf.

Funktionelle Äquivalente meint insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen der obengenannten Speicherproteine sowie homologe Polypeptide aus anderen Pflanzen, die die gleichen wesentlichen und - bevorzugt - charakteristischen Eigenschaften aufweisen. Bevorzugt sind homologe Polypeptide aus oben beschriebenen bevorzugten Pflanzen. Die zu den im Rahmen dieser Erfindung offenbarten Speicherproteinen homologen Sequenzen aus anderen Pflanzen - beispielsweise solchen deren genomische Sequenz ganz oder teilweise bekannt ist, wie beispielsweise aus *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum* oder *Solanum tuberosum* - durch Homologievergleiche aus Datenbanken auffinden können z.B. durch Datenbanksuche oder Durchmustern von Gen-Banken - unter Verwendung der beispielhaft aufgeführten Speicherprotein-Sequenzen als Suchsequenz bzw. Sonde - leicht aufgefunden werden.

Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurereste.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung umfasst ein zumindest teilweise doppelsträngiges Ribonukleinsäuremolekül, wobei das doppelsträngige Ribonukleinsäuremolekül umfasst

i) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens zwei Ribonukleotidsequenzabschnitte, wobei jeweils mindestens einer dieser Ribonukleotidsequenzabschnitte im wesentlichen

34

identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes einer Speicherprotein-Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 oder 112 oder eines funktionellen Äquivalents derselben, wobei jedoch nicht alle Ribonukleotidsequenzabschnitte zu dem "sense"-RNA-Transkript eines einzigen einer Speicherprotein-Nukleinsäuresequenz identisch sind, und

ii) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter i) im wesentlichen komplementären ist.

Bevorzugt haben zumindest zwei der Speicherprotein-Nukleinsäuresequenzen, zu deren "sense"-RNA-Transkript die besagten Ribonukleotidsequenzabschnitte im wesentlichen identisch sind, untereinander eine Homologie von unter 90%, bevorzugt unter 80%, ganz besonders bevorzugt unter 60% am meisten bevorzugt unter 50% über die gesamte Länge ihrer kodierenden Nukleotidsequenz.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die dsRNA mehrere Sequenzabschnitte, die eine gleichzeitige Suppression mehrerer Speicherproteine, bevorzugt von Speicherproteinen aus verschiedenen Klassen - wie beispielsweise einem 2S-Albumin, 7S-Globuline, 11S/12S-Globulin oder die Zein-Prolamine - bewirken.

Am meisten bevorzugt sind doppelsträngige RNA Moleküle beschrieben durch die Ribonukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 84, 86 oder 88. Diese werden bevorzugt kodiert durch Nukleotidsequenzen entsprechend SEQ ID NO: 83, 85 oder 87.

35 5. Erreichen einer Resistenz gegen pflanzliche Pathogene

Eine Resistenz gegen pflanzliche Pathogene wie Arachniden, Pilze, Insekten, Nematoden, Protozoen, Viren, Bakterien und Krankheiten kann erreicht werden durch Verminderung der Genexpression von Genen, die für das Wachstum, Überleben, bestimmte Entwicklungsstufen (beispielsweise Verpuppung) oder die Vermehrung einer bestimmten Pathogens essentiell sind. Eine entsprechende Verminderung kann eine vollständige Inhibition vorgenannter Schritte aber auch eine Verzögerung derselben bewirken. Dies können pflanzliche Gene sein, die dem Pathogen beispielsweise das Eindringen ermöglichen, können aber auch pathogen-eigene Gene sein. Bevorzugt ist die dsRNA

35

gg. Gene des Pathogens gerichtet. Als anti-Pathogenes Agens kann dabei die dsRNA selber, jedoch auch die Expressionssysteme, Expressionskassetten oder transgenen Organismen wirken. Pflanzen können beispielsweise mit geeigneten Formulierungen vorgenannter Agentien behandelt, beispielsweise besprüht oder estäubt werden. Die Pflanzen selber können jedoch in Form eines transgenen Organismus die Agentien beinhalten und diese - beispielsweise in Form eines Fraßgiftes - an die Pathogene weitergeben. Verschiedene essentielle Gene diverser Pathogene sind dem Fachmann bekannt (z.B. für Nematodenresistenz WO 93/10251, WO 94/17194).

Am meisten bevorzugt als Pathogen sind Pilzpathogene wie Phytophthora infestans, Fusarium nivale, Fusarium graminearum, Fusarium culmorum, Fusarium oxysporum, Blumeria graminis, Magnaporthe grisea, Sclerotinia sclerotium, Septoria nodorum, Septoria tritici, Alternaria brassicae, Phoma lingam, bakterielle Pathogene wie Corynebacterium sepedonicum, Erwinia carotovora, Erwinia amylovora, Streptomyces scabies, Pseudomonas syringae pv. tabaci, Pseudomonas syringae pv. phaseolicola, Pseudomonas syringae pv. tomato, Xanthomonas campestris pv. malvacearum und Xanthomonas campestris pv. oryzae, und Nematoden wie Globodera rostochiensis, G. pallida, Heterodera schachtii, Heterodera avenae, Ditylenchus dipsaci, Anguina tritici und Meloidogyne hapla.

Eine Virusresistenz kann beispielsweise durch Verminderung der Expression eines viralen Hüllproteins, einer viralen Replikase, einer viralen Protease etc. erreicht werden. Zahlreiche Pflanzenviren und entsprechende Zielgene sind dem Fachmann bekannt.

6. Verhinderung von Halmbruch

Eine verminderte Anfälligkeit gegen Halmbruch kann beispielsweise erreicht werden durch Verminderung der Genexpression von Genen des Kohlenhydratstoffwechsels (s.o.). Vorteilhafte Gene sind beschrieben (u.a. WO 97/13865) und umfassen gewebespezifische Polygalacturonasen oder Cellulasen.

40
7. Verzögerung der Fruchtreifung

Eine verzögerte Fruchtreifung kann beispielsweise erreicht werden durch Verminderung der Genexpression von Genen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Polygalacturonasen, Pectinesterasen, β -(1-4)glucanasen (Cellulasen), β -Galactanasen (β -Galactosidasen), oder Gene der Ethylenbiosynthese wie

36

1-Aminocyclopropan-1-carboxylatsynthase, Gene der Carotinoid-biosynthese wie z.B. Gene der Prephytoen- oder Phytoenbiosynthese beispielsweise Phytoendesaturasen. Weitere vorteilhafte Gene sind beispielsweise in WO 91/16440, WO 91/05865, WO 5 91/16426, WO 92/17596, WO 93/07275 oder WO 92/04456.

8. Erzielen einer männlichen Sterilität ("male sterility"). Entsprechende Zielgene sind beschrieben u.a. in WO 94/29465, WO 89/10396, WO 92/18625.

10 9. Verminderung unerwünschter oder toxischer Pflanzeninhaltsstoffe wie z.B. Glucosinolaten. Entsprechende Zielgene sind beschrieben (u.a. in WO 97/16559).

15 10. Verzögerung von Alterserscheinungen. Entsprechende Zielgene sind u.a. Cinnamoyl-CoA:NADPH-Reduktasen oder Cinnamoylalkoholdehydrogenasen. Weitere Zielgene sind beschrieben (u.a. in WO 95/07993).

20 11. Modifikation der Lignifikation und/oder des Ligningehaltes vor allem in Baumarten. Entsprechende Zielgene sind beschrieben u.a. in WO 93/05159, WO 93/05160.

25 12. Modifikation des Faseranteils in Nahrungsmitteln vorzugsweise in Samen durch Verminderung der Expression der Coffeinsäure-O-methyltransferase oder der Cinnamoylalkoholdehydrogenase.

13. Modifikation der Faserqualität in Baumwolle. Entsprechende Zielgene sind beschrieben u.a. in US 5,597,718.

30 14. Verminderung der Stoßanfälligkeit von beispielsweise Kartoffeln durch Verminderung beispielsweise der Polyphenoloxidase (WO 94/03607) etc.

35 15. Steigerung der Vitamin E Biosynthese beispielsweise durch Verminderung der Expression von Genen aus dem Homogentisatabauweg wie z.B. der Homogentisat-1,2-dioxygenase (HGD; EC-Nr.: 1.13.11.5), der Maleylacetoacetatisomerase (MAAI; EC-Nr.: 5.2.1.2.) oder der Fumarylacetoacetathiolase (FAAH; EC-Nr.: 3.7.1.2).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung umfasst ein zumindest teilweise doppelsträngiges Ribonukleinsäuremolekül, wobei das doppelsträngige Ribonukleinsäuremolekül umfasst

i) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens zwei Ribonukleotidsequenzabschnitte, wobei jeweils mindestens einer dieser Ribonukleotidsequenzabschnitte im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines Gens aus dem Homogentisatabbauweg gemäß SEQ ID NO: 115, 116, 118 oder 120 oder eines funktionalen Äquivalentes derselben, wobei jedoch nicht alle Ribonukleotidsequenzabschnitte zu dem "sense"-RNA-Transkript eines einzigen einer Speicherprotein-Nukleinsäuresequenz identisch sind, und

ii) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter i) im wesentlichen komplementären ist.

15 16. Verminderung des Nikotingehaltes beispielsweise in Tabak durch verminderte Expression beispielsweise der N-Methylputrescinoxidase und der Putrescin-N-methyltransferase.

17. Verminderung des Coffeingehaltes in der Kaffeebohne (*Coffea arabica*) durch durch Verminderung der Genexpression von Genen der Coffeinbiosynthese wie 7-Methylxanthine-3-methyltransferase.

25 18. Verminderung des Theophyllin-Gehaltes im Tee (*Camellia sinensis*) durch durch Verminderung der Genexpression von Genen der Theophyllin-Biosynthese wie beispielsweise 1-Methylxanthin-3-methyltransferase.

30 19. Erhöhung des Methioningehaltes durch Verminderung der Threoninbiosynthese, beispielsweise durch Verminderung der Expression der Threoninsynthase (Zeh M et al .(2001) Plant Physiol 127(3):792-802).

35 Weitere Beispiele für vorteilhafte Gene sind zum Beispiel genannt bei Dunwell JM, Transgenic approaches to crop improvement, J Exp Bot. 2000;51 Spec No; Seite 487-96.

40 Jede der oben genannten Anwendungen kann als solche isoliert angewendet werden. Natürlich können auch mehr als eine der oben genannten Ansätze gleichzeitig angewendet werden. Dabei wird bei allen Anwendungen die Expression von mindestens zwei unterschiedlichen Zielgenen, wie oben definiert, vermindert. Diese Zielgene können dabei aus einer einzigen für eine Anwendung bevorzugten Gruppe von Genen stammen oder aber auch unterschiedlichen Anwendungsgruppen zugeordnet sein.

Zur Anwendung der erfindungsgemäßen Verfahren stehen dem Fachmann geläufige Werkzeuge, wie Expressionsvektoren mit für Pflanzen geeigneten Promotoren, sowie Verfahren zur Transformation und Regeneration von Pflanzen zur Verfügung. Pflanzenspezifische

5 Promotoren meint grundsätzlich jeden Promotor, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen oder Pflanzenteilen, -zellen, -geweben, -kulturen steuern kann. Dabei kann die Expression beispielsweise konstitutiv, induzierbar oder entwicklungsabhängig sein. Bevorzugt sind:

10

a) Konstitutive Promotoren

"Konstitutive" Promotoren meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen 15 größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten (Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der 20 Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221- 228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) 25 EMBO J 8:2195-2202). Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der "Rubisco small subunit (SSU)" -Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. 30 (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor, den Cinnamylal-koholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der 35 vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

40 b) Gewebespezifische Promotoren

Bevorzugt sind ferner Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Blüten, Blätter, Stengel, Wurzeln und Samen.

45 Samenspezifische Promotoren wie zum Beispiel der Promotor des Phaseolins (US 5,504,200; Bustos MM et al. (1989) Plant Cell 1(9):839-53), des 2S Albumingens (Joseffson LG et al. (1987) J

39

Biol Chem 262:12196-12201), des Legumins (Shirsat A et al. (1989) Mol Gen Genet 215(2): 326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225(3):459-67), des Napin Gens (US 5,608,152; Stalberg K et al. (1996) L Planta 199:515-519), des Saccharosebindeproteins (WO 00/26388) oder der Legumin B4-Promotor (LeB4; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225: 121-128; Baeumlein et al. (1992) Plant Journal 2(2):233-9; Fiedler U et al. (1995) Biotechnology (NY) 13(10):1090f), der Oleosin-Promoter aus Arabidopsis (WO 98/45461), der Bce4-Promoter aus Brassica (WO 91/13980). Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, Verzweigungsenzym, ADP Glucose Pyrophosphatase (AG-Pase) oder die Stärkesynthase. Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine samenspezifische Expression in Monokotyledonen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc. erlauben. Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promoter des lpt2 oder lpt1-Gen (WO 95/15389, WO 95/23230) oder die Promotoren beschrieben in WO 99/16890 (Promotoren des Hordein-Gens, des Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens, des Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Glutelin-Gens, des Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens). Weitere samenspezifische Promotoren sind beschrieben in WO89/03887.

Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren wie beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33), der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

Blattspezifische Promotoren wie Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451).

Blütenspezifische Promotoren wie beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593).

- Antheren-spezifische Promotoren wie den 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-1 Promotor und den γ -Zein Promotor.

c) Chemisch induzierbare Promotoren

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die

40

Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 5 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

d) Stress- oder Pathogen-induzierbare Promotoren

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPDK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).

Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, β -1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknnes, et al. (1992) The Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Viral 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) The Plant J 45 6(2):141-150) und dergleichen.

e) Entwicklungsabhängige Promotoren

Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifungsspezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifungsspezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die Gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

Besonders bevorzugt sind konstitutive sowie samenspezifische Promotoren.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionsteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH, J Biol Chem 1991; 266(26): 17131 -17135) und Hitzestress (Schoffl F et al., Molecular & General Genetics 217(2-3):246-53, 1989) beschrieben.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielhaft für Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebsspezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant. J 15:435-440).

Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACHS entsprechen (Gielen et al. (1984) EMBO J 3:835 ff) oder funktionelle Äquivalente davon. Beispiele für besonders geeignete Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopaline-Synthase)-Terminator.

Eine Expressionskassetten und die von ihr abgeleiteten Vektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente,

42

die einen Einfluss auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemässen Expressionskassetten, Vektoren oder transgenen Organismen haben. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

5

a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika oder Biozide, bevorzugt Herbizide, wie zum Beispiel Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin, oder Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und Glutaminsynthaseinhibitoren inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat®. (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen, das für das Glyphosat® degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase), das deh Gen (kodierend für eine Dehalogenase, die Dalapon inaktiviert), Sulfonylurea- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen sowie bxn Gene, die für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren, das aasa-Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin verleiht, das Streptomycinphosphotransferase (SPT) Gen, das eine Resistenz gegen Streptomycin gewährt, das Neomycinphosphotransferas (NPTII) Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin oder Geneticidin verleiht, das Hygromycinphosphotransferase (HPT) Gen, das eine Resistenz gegen Hygromycin vermittelt, das Acetolactatsynthas Gen (ALS), das eine Resistenz gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide verleiht (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra Mutation).

b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al. (1995) Plant Journal 8(5):777-784), die Chloramphenicoltransferase, eine Luziferase (Ow et al. (1986) Science 234:856-859), das Aequorin-Gen (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268); die β-Galactosidase, ganz besonders bevorzugt ist die β-Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907).

c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungs-gemässen Expressionskassetten oder Vektoren in zum Beispiel E.coli gewährleisten. Beispielhaft seien genannt ORI (origin of DNA replication), der pBR322 ori oder der P15A ori (Sam-brook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

d) Elemente, die für eine Agrobakterium vermittelte Pflanzen-transformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

Zur Selektion erfolgreich homolog rekombinierter oder auch trans-formierter Zellen ist es in der Regel erforderlich, einen selek-tionierbaren Marker zusätzlich einzuführen, der den erfolgreich 15 rekombinierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Bei-spiel ein Herbizid), einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglu-cose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen 20 von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84).

Verschiedene Methoden und Vektoren zum Einschleusen von Genen in das Genom von Pflanzen sowie zur Regeneration von Pflanzen aus 25 Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen sind bekannt (Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapi-tel 6/7, S. 71-119 (1993); White FF (1993) Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Enginee-ring and Utilization, Hrsgb.: Kung und Wu R, Academic Press, 30 15-38; Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, S.128-143; Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225; Halford NG, Shewry PR (2000) Br Med Bull 56(1):62-73). Dazu zählen beispielhaft die 35 oben erwähnten. Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Me-thoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte 40 DNA-Aufnahme, die Liposomen vermittelte Transformation (wie z.B. in US 4,536,475 beschrieben), biolistische Verfahren mit der Gen-kanone ("particle bombardment" Methode; Fromm ME et al. (1990) Bio/Technology. 8(9):833-9; Gordon-Kamm et al. (1990) The Plant Cell 2:603), die Elektroporation, die Inkubation trockener Em-45 bryonen in DNA-haltiger Lösung und die Mikroinjektion. Im Falle dieser "direkten" Transformationsmethoden sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plas-

mide wie die der pUC-Reihe, pBR322, M13mp Reihe, pACYC184 etc. können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist es erforderlich, dass sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares 5 Markergen befindet.

Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels Agrobacterium (z.B. EP 0 116 718), virale Infektion mittels viraler Vektoren 10 (EP 0 067 553; US 4,407,956; WO 95/34668; WO 93/03161) oder mittels Pollen (EP 0 270 356; WO 85/01856; US 4,684,611) durchgeführt werden.

Die für die Agrobacterium-Transformation meist verwendeten 15 Stämme Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes eine auch durch bakterielle Infektion mittels enthalten ein Plasmid (Ti bzw. Ri Plasmid), das auf die Pflanze nach Agrobacterium-Infektion übertragen wird. Ein Teil dieses Plasmids, genannt T-DNA (transferred DNA), wird in das Genom der Pflanzenzelle integriert. Alternativ können durch Agrobakterium auch binäre vektoren (Mini-Ti-Plasmide) auf Pflanzen übertragen und in deren Genom 20 integriert werden. Die Agrobacterium-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone, diploide Pflanzenzellen geeignet, wohingegen die direkten Transformationstechniken sich für jeden 25 Zelltyp eignen. Verfahren zur Agrobakterium vermittelten Transformation sind beispielsweise beschrieben bei Horsch RB et al. (1985) Science 225:1229f. Werden Agrobakterien verwendet, so ist die Expressionskassette in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or interme- 30 diate vector) oder einen binären Vektor. Wird ein Ti oder Ri Plasmid zur Transformation verwendet werden soll, ist zumindest die rechte Begrenzung, meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit der einzuführenden Expressionskassette verbunden.

35 Für die Agrobacterium Tranformation werden bevorzugt binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren können sowohl in E.coli als auch in Agrobacterium replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker flankiert von 40 der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in Agrobacterium transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187). Das Selektionsmarkergen erlaubt eine Selektion transformierter Agrobakteria und ist zum Beispiel das nptII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht. Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobacterium sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche 45

Zelle erforderlich. Ein so transformiertes Agrobacterium kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblaserdam, Chapter V; An et al. (1985) EMBO J 4:277-287). Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. USA; Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711),
10 pBinAR, pPZP200 oder pPTV.

Die mit einem solchen Vektor transformierten Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Raps, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschliessend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist beschrieben (White FF, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15 - 38; Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, S.128-143; Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205- 225). Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die integriert die oben beschriebenen erfindungsgemässen Expressionssysteme enthalten.

30 Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz gegen Antibiotika oder Herbizide (wie Kanamycin, G418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin etc.) zu verleihen vermag (s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder Herbicides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiel sind oben genannt und umfassen bevorzugt das bar Gen, dass Resistenz gegen das Herbizid Phosphinotricin verleiht. (Rathore KS et al. (1993) Plant Mol Biol 21(5):871-884), das nptII Gen, dass Resistenz gegen Kanamycin verleiht, das hpt Gen, das Resistenz gegen Hygromycin verleiht,
40 45 oder das EPSP-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986)

46

Plant Cell Reports 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten vorzugsweise kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich
5 ist.

Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft
10 von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Fennell et al. (1992) Plant Cell Rep. 11: 567-570; Stoeger et al
15 (1995) Plant Cell Rep. 14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533).

Die Wirksamkeit der Expression der transgen exprimierten Nukleinsäuren kann beispielsweise *in vitro* durch Sprossmeristemvermehrung unter Verwendung einer der oben beschriebenen Selektionsmethoden ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression eines Zielgens und die Auswirkung auf den Phänotyp der Pflanze an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.
25

II. Medizinische Anwendungen

Die erfindungsgemäß bereitgestellten dsRNA, Expressionssysteme oder Organismen eignen sich zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von menschlichen und tierischen Erkrankungen. Für eine effiziente Therapie ist es oft unzureichend nur ein einzelnes Zielgen zu vermindern. Das erfindungsgemäß Verfahren eignet sich insbesondere zur Behandlung von
30 - Pathogenbefall, wie beispielsweise virale oder bakterielle Erkrankungen. In diesen Fällen führen Ansätze, die lediglich gegen ein molekulares Ziel gerichtet sind, oft zu der Ausbildung von Resistenzen. Eine Kombinationstherapie, die mehrere Ziele abdeckt, ist jedoch kompliziert zu koordinieren und v.a. nur sehr aufwendig in klinischen
35 Experimenten zu evaluieren. Das erfindungsgemäß Verfahren ermöglicht hier eine vorteilhafte Alternative. Die inhibitorische dsRNA kann dabei in der dem Fachmann geläufigen Weise appliziert werden. dsRNA verfügt über eine
40 erstaunliche Stabilität und effiziente Wirkung und kann beispielsweise durch Verfütterung entsprechender dsRNA exprimierenden Bakterien appliziert werden. Das Verfahren
45

5 eignet sich insbesondere zur Behandlung von viralen Infektionen z.B. mit dem "human immunodeficiency virus" (HIV), indem gleichzeitig die Expression von mindestens zwei viralen Gene vermindert wird, beispielsweise bei HIV von Genen wie gp41, die für den Zelleintritt verantwortlich sind, und der viralen Replikase oder reversen Transkriptase.

10 - Behandlung von Krebs (beispielsweise solider Tumore und/oder Leukämien). Zahlreiche potentialle Zielgene sind hier dem Fachmann bekannt (z.B. Oncogene wie ABL1, BCL1, BCL2, BCL6, CBFA2, CBL, CSF1R, ERBA, ERBB, EBRB2, FGR, FOS, FYN, HRAS, JUN, LCK, LYN, MYB, MYC, NRAS, RET oder SRC; Tumorsuppressorgene wie BRCA1 oder BRCA2; Adhäsionsmoleküle; Cyclinekinasen und deren Inhibitoren).

15

20 Weitere potentiell mit dem erfindungsgemäßen Verfahren behandelbare Erkrankungen und die entsprechenden Zielgene sind dem Fachmann ohne weiteres zugänglich und umfassen beispielsweise Erkrankungen des Herz/Kreislaufsystems wie Bluthochdruck, Erkrankungen des zentralen oder peripheren Nervensystems wie Alzheimer, Parkinson oder multiple Sklerose usw. Auch ist es durch das erfindungsgemäße Verfahren möglich, mehr als eine Erkrankung parallel zu behandeln, wie beispielsweise ein Herzkreislauferkrankung und eine Erkrankung des zentralen Nervensystems, was durch klassische Ansätze nicht möglich ist. Derartige Ansätze sind v.a. bei multiplen Erkrankungen wie sie oft im fortgeschrittenen Alter auftreten vorteilhaft. Beispielhaft sei die parallele Behandlung von Bluthochdruck und z.B. Alzheimer oder seniler Demenz zu nennen. Dabei kann dieser Anwendungen als solche isoliert angewendet werden. Natürlich können auch mehr als eine der oben genannten Ansätze gleichzeitig angewendet werden. Dabei wird bei allen Anwendungen die Expression von mindestens zwei unterschiedlichen Zielgenen vermindert. Diese Zielgene können dabei aus der für eine Anwendung bevorzugten Gruppe von Genen stammen oder aber auch unterschiedlichen Anwendungsgruppen zugeordnet sein.

25

30

35

III. Biotechnologische Anwendungen

40 Das erfindungsgemäße Verfahren lässt sich vorteilhaft in biotechnologischen Verfahren anwenden. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend sei zu nennen die Optimierung von Stoffwechselwegen in fermentativ genutzten Hefen, Pilzen oder anderen eukaryotischen Mikroorganismen oder Zellen zur Herstellung von Feinchemikalien wie Aminosäuren (z.B. Lysin oder Methionin), Vitaminen (wie Vitamin B2, Vitamin C, Vitamin E), Carotinoi-

45

den, Ölen und Fetten, polyungesättigten Fettsäuren, Biotin usw. Dabei kann dieser Anwendungen als solche isoliert angewendet werden. Natürlich können auch mehr als eine der oben genannten Ansätze gleichzeitig angewendet werden. Dabei wird 5 bei allen Anwendungen die Expression von mindestens zwei unterschiedlichen Zielgenen vermindert. Diese Zielgene können dabei aus der für eine Anwendung bevorzugten Gruppe von Genen stammen oder aber auch unterschiedlichen Anwendungsgruppen zugeordnet sein.

10 Als Vektoren zur Expression in E.coli sind bevorzugt pQE70, pQE60 und pQE-9 (QIAGEN, Inc.); pBluescript Vektoren, Phagescript Vektoren, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene Cloning Systems, Inc.); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia Biotech, Inc.).

Bevorzugte Vektoren zur eukaryotischen Expression umfassen 15 pWLNE0, pSV2CAT, pOG44, pXT1 und pSG (Stratagene Inc.); pSVK3, pBPV, pMSG und pSVL (Pharmacia Biotech, Inc.). Als induzierbare Vektoren seien pTet-tTak, pTet-Splice, pcDNA4/TO, pcDNA4/TO / LacZ, pcDNA6/TR, pcDNA4/TO/Myc-His /LacZ, pcDNA4/TO/Myc-His A, pcDNA4/TO/Myc-His B, pcDNA4/TO/Myc-His C, pVgRXR (Invitrogen, Inc.) oder die pMAM-Serie (Clontech, Inc.; GenBank Accession No.: U02443) zunennen. Diese stellen bereits das induzierbare regula- 20 torische Kontrollelement beispielsweise für eine chemisch, induzierbare Expression eines DSBI-Enzyms zur Verfügung. In diese Vektoren kann die Nukleinsäuresequenz kodierend für ein DSBI-Enzym direkt insertiert werden.

30 Vektoren für die Expression in Hefe umfassen beispielhaft pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalph, pPIC9, pPIC3.5, PHIL-D2, PHIL-S1, pPIC3SK, pPIC9K, und PA0815 (Invitrogen, Inc.).

35 Vorteilhafte Kontrollsequenzen sind beispielsweise die gram-positiven Promotoren amy und SPO2, und die Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MFa , AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH.

Klonierungsvektoren und Techniken zur genetischen Manipulation 40 von Ciliaten und Algen sind dem Fachmann bekannt (WO 98/01572; Falciatore et al. (1999) Marine Biotechnology 1(3):239-251; Dunahay et al. (1995) J Phycol 31:10004-1012).

Als Selektionsmarker können prinzipiell viele der auch für Pflanzen bevorzugten Selektionssysteme verwendet werden. Insbesondere 45 bevorzugt sind für Säugerzelle die Neomycin (G418) Resistenz, die Hygromycin-Resistenz, die Zeocin-Resistenz oder die Puromycin-Re-

49

sistenz. Für Prokaryoten ist insbesondere die Ampicillin-Resistenz, die Kanamycin-Resistenz oder die Tetracyclin-resistant bevorzugt.

5 Prinzipiell sind für die Transformation tierischer Zelle oder von Hefezellen ähnliche Verfahren wie für die "direkte" Transformation von pflanzlichen Zellen anzuwenden. Insbesondere Verfahren wie die Calciumphosphat oder Liposomen vermittelte Transformation oder aber Elektroporation sind bevorzugt.

10

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemässen, transgenen Organismen und der von ihnen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Beispiel bei transgenen pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.- , und transgenes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte, zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien, wie beispielsweise Enzymen, Vitaminen, Aminosäuren, Zucker, Fettsäuren, natürliche und synthetische Geschmacks-, Aroma- und Farbstoffe. Besonders bevorzugt ist die Produktion von Triacylglyceriden, Lipiden, Ölen, Fettsäuren, Stärke, Tocopherolen und Tocotrienolen sowie Carotinoiden. Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemässe, genetisch veränderte Pflanzen können auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Aufbereitung als Nahrungsmittel oder Futtermittel verwendet werden.

25

30

35

40

45

50

Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1
Nukleinsäuresequenz kodierend für A.thaliana Albumin 2S sub-unit 1 (GenBank Acc.-No.: M22032)
2. SEQ ID NO: 2
Proteinsequenz kodierend für A.thaliana Albumin 2S subunit 1
- 10 3. SEQ ID NO: 3
Nukleinsäuresequenz kodierend für A.thaliana Albumin 2S sub-unit 3 (GenBank Acc.-No.: M22035)
4. SEQ ID NO: 4
15 Proteinsequenz kodierend für A.thaliana Albumin 2S subunit 3
5. SEQ ID NO: 5
Nukleinsäuresequenz kodierend für A.thaliana Albumin 2S sub-unit 2 (GenBank Acc.-No.: M22034)
- 20 6. SEQ ID NO: 6
Proteinsequenz kodierend für A.thaliana Albumin 2S subunit 2
7. SEQ ID NO: 7
25 Nukleinsäuresequenz kodierend für A.thaliana Albumin 2S sub-unit 4 (GenBank Acc.-No.: M22033)
8. SEQ ID NO: 8
Proteinsequenz kodierend für A.thaliana Albumin 2S subunit 4
- 30 9. SEQ ID NO: 9
Nukleinsäuresequenz kodierend für B.napus Cruciferin Speicherprotein (GenBank Acc.-No.: X59294)
- 35 10. SEQ ID NO: 10
Proteinsequenz kodierend für B.napus Cruciferin Speicherprotein
11. SEQ ID NO: 11
40 Nukleinsäuresequenz kodierend für Brassica napus Cruciferin (GenBank Acc.-No.: X14555)
12. SEQ ID NO: 12
Proteinsequenz kodierend für Brassica.napus Cruciferin

13. SEQ ID NO: 13
Nukleinsäuresequenz kodierend für B.napus BnC2 Cruciferin Speicherprotein (GenBank Acc.-No.: X59295)
- 5 14. SEQ ID NO: 14
Proteinsequenz kodierend für B.napus BnC2 Cruciferin Speicherprotein
- 10 15. SEQ ID NO: 15
partielle Nukleinsäuresequenz kodierend für B.napus Cruciferin cru4 subunit (GenBank Acc.-No.: X57848)
- 15 16. SEQ ID NO: 16
partielle Proteinsequenz kodierend für B.napus Cruciferin cru4 subunit
- 20 17. SEQ ID NO: 17
Nukleinsäuresequenz kodierend für B.napus crul Cruciferin subunit (GenBank Acc.-No.: X62120)
18. SEQ ID NO: 18
Proteinsequenz kodierend für B.napus crul Cruciferin subunit
- 25 19. SEQ ID NO: 19
Nukleinsäuresequenz kodierend für Glycinin A-1a-B-x subunit aus des Sojabohne (GenBank Acc.-No.: M36686)
- 30 20. SEQ ID NO: 20
Proteinsequenz kodierend für Glycinin A-1a-B-x subunit aus des Sojabohne
21. SEQ ID NO: 21
Nukleinsäuresequenz kodierend für Sojabohne Glycinin subunit G2 (GenBank Acc.-No.: X15122)
- 35 22. SEQ ID NO: 22
Proteinsequenz kodierend für Sojabohne Glycinin subunit G2
23. SEQ ID NO: 23
40 Nukleinsäuresequenz kodierend für Sojabohne A5A4B3 Glycinin subunits (GenBank Acc.-No.: X02626)
- 45 24. SEQ ID NO: 24
Proteinsequenz kodierend für Sojabohne A5A4B3 Glycinin subunits

25. SEQ ID NO: 25
Nukleinsäuresequenz kodierend für Sojabohne (G.max) Glycinin Speicherprotein subunit A3-B4 (GenBank Acc.-No.: M10962)

5 26. SEQ ID NO: 26
Proteinsequenz kodierend für Sojabohne (G.max) Glycinin Speicherprotein subunit A3-B4

27. SEQ ID NO: 27
10 Nukleinsäuresequenz kodierend für Sojabohne Glycinin subunit G3 (GenBank Acc.-No.: X15123)

28. SEQ ID NO: 28
15 Proteinsequenz kodierend für Sojabohne Glycinin subunit G3

29. SEQ ID NO: 29
Nukleinsäuresequenz kodierend für Sonnenblume 11S Speicherprotein (G3-D1) (GenBank Acc.-No.: M28832)

20 30. SEQ ID NO: 30
Proteinsequenz kodierend für Sonnenblume 11S Speicherprotein (G3-D1)

31. SEQ ID NO: 31
25 Nukleinsäuresequenz kodierend für Raps (B.napus) Napin (GenBank Acc.-No.: J02586)

32. SEQ ID NO: 32
Proteinsequenz kodierend für Raps (B.napus) Napin

30 33. SEQ ID NO: 33
Nukleinsäuresequenz kodierend für Brassica juncea 2S Speicherprotein (GenBank Acc.-No.: X65040)

35 34. SEQ ID NO: 34
Proteinsequenz kodierend für Brassica juncea 2S Speicherprotein

35. SEQ ID NO: 35
40 Nukleinsäuresequenz kodierend für Brassica oleracea 2S Speicherprotein (GenBank Acc.-No.: X65038)

36. SEQ ID NO: 36
45 Proteinsequenz kodierend für Brassica oleracea 2S Speicherprotein

37. SEQ ID NO: 37
Nukleinsäuresequenz kodierend für Brassica napus cv. Topas Napin (GenBank Acc.-No.: U04945)

5 38. SEQ ID NO: 38
Proteinsequenz kodierend für Brassica napus cv. Topas Napin

39. SEQ ID NO: 39
partielle Nukleinsäuresequenz kodierend für Sinapis alba sin1
10 Speicherprotein (GenBank Acc.-No.: X91799)

40. SEQ ID NO: 40
partielle Proteinsequenz kodierend für Sinapis alba sin1
Speicherprotein

15 41. SEQ ID NO: 41
Nukleinsäuresequenz kodierend für Sojabohne (Glycine max) napin-type 2S Albumin 1 (GenBank Acc.-No.: U71194)

20 42. SEQ ID NO: 42
Proteinsequenz kodierend für Sojabohne (Glycine max) napin-type 2S Albumin 1

43. SEQ ID NO: 43
25 Nukleinsäuresequenz kodierend für Sojabohne (Glycine max) 2S Albumin (GenBank Acc.-No.: AF005030)

44. SEQ ID NO: 44
30 Proteinsequenz kodierend für Sojabohne (Glycine max) 2S Albumin

45. SEQ ID NO: 45
35 Nukleinsäuresequenz kodierend für Brassica nigra 2S Speicherprotein (GenBank Acc.-No.: X65039)

46. SEQ ID NO: 46
35 Proteinsequenz kodierend für Brassica nigra 2S Speicherprotein

40 47. SEQ ID NO: 47
Nukleinsäuresequenz kodierend für Sinapis alba sin5 Speicherprotein (GenBank Acc.-No.: X91798)

48. SEQ ID NO: 48
45 Proteinsequenz kodierend für Sinapis alba sin5 Speicherprotein

49. SEQ ID NO: 49
Nukleinsäuresequenz kodierend für Sonnenblume HaG5 2 S Albumin (GenBank Acc.-No.: X06410)

5 50. SEQ ID NO: 50
proteinsequenz kodierend für Sonnenblume HaG5 2 S Albumin

10 51. SEQ ID NO: 51
partielle Nukleinsäuresequenz kodierend für Sonnenblume (Helianthus annuus) 2S Albumin (GenBank Acc.-No.: X76101)

15 52. SEQ ID NO: 52
partielle Proteinsequenz kodierend für Sonnenblume (Helianthus annuus) 2S Albumin

20 53. SEQ ID NO: 53
Nukleinsäuresequenz kodierend für dsRNA zur Suppression von Arabidopsis thaliana 12S Speicherprotein AtCru3 (Insert von Vektor pCR2.1-AtCRU3-RNAi)

25 54. SEQ ID NO: 54
Ribonukleinsäuresequenz kodierend für dsRNA zur Suppression von Arabidopsis thaliana 12S Speicherprotein AtCru3

30 55. SEQ ID NO: 55
Nukleinsäuresequenz kodierend für dsRNA zur Suppression von Arabidopsis thaliana 12S Speicherprotein AtCra1

35 56. SEQ ID NO: 56
Ribonukleinsäuresequenz kodierend für dsRNA zur Suppression von Arabidopsis thaliana 12S Speicherprotein AtCra1

40 57. SEQ ID NO: 57
Nukleinsäuresequenz kodierend für dsRNA zur Suppression von Arabidopsis thaliana 2S Speicherprotein At2S2

58. SEQ ID NO: 58
Ribonukleinsäuresequenz kodierend für dsRNA zur Suppression von Arabidopsis thaliana 2S Speicherprotein At2S2

45 59. SEQ ID NO: 59
Nukleinsäuresequenz kodierend für Arabidopsis thaliana 12S Cruciferin Speicherprotein (ATCRU3; GenBank Acc.-No.: U66916)

60. SEQ ID NO: 60
Proteinsequenz kodierend für Arabidopsis thaliana 12S Cruciferin Speicherprotein (ATCRU3)

5 61. SEQ ID NO: 61
Nukleinsäuresequenz kodierend für A.thaliana 12S Speicherprotein (CRA1; GenBank Acc.-No.: M37247)

62. EQ ID NO: 62
10 Proteinsequenz kodierend für A.thaliana 12S Speicherprotein (CRA1)

63. SEQ ID NO: 63
15 Nukleinsäuresequenz kodierend für Arabidopsis thaliana 12S Speicherprotein AT5g44120/MLN1_4 (GenBank Acc.-No.: AY070730)

64. SEQ ID NO: 64
Proteinsequenz kodierend für Arabidopsis thaliana 12S Speicherprotein AT5g44120/MLN1_4

20 65. SEQ ID NO: 65
Nukleinsäuresequenz kodierend für Arabidopsis 12S Speicherprotein (CRB; GenBank Acc.-No.: X14313; M37248)

25 66. SEQ ID NO: 66
Proteinsequenz kodierend für Arabidopsis 12S Speicherprotein (CRB)

67. SEQ ID NO: 67
30 Nukleinsäuresequenz kodierend für Arabidopsis thaliana putatives 12S Speicherprotein (aus GenBank Acc.-No.: AC003027)

68. SEQ ID NO: 68
35 Proteinsequenz kodierend für Arabidopsis thaliana putatives Speicherprotein (Protein_id="AAD10679.1")

69. SEQ ID NO: 69
Nukleinsäuresequenz kodierend für Arabidopsis thaliana Cruciferin 12S Spwicherprotein (At1g03890) (GenBank Acc.-No.:
40 AY065432)

70. SEQ ID NO: 70
Proteinsequenz kodierend für Arabidopsis thaliana Cruciferin 12S Speicherprotein (At1g03890)

56

71. SEQ ID NO: 71
Nukleinsäuresequenz kodierend für Arabidopsis thaliana Prohibitin 1 (Atphb1) (GenBank Acc.-No.: U66594)

5 72. SEQ ID NO: 72
Proteinsequenz kodierend für Arabidopsis thaliana Prohibitin 1 (Atphb1)

10 73. SEQ ID NO: 73 Oligonukleotidprimer OPN1

74. SEQ ID NO: 74 Oligonukleotidprimer OPN2

75. SEQ ID NO: 75 Oligonukleotidprimer OPN3

15 76. SEQ ID NO: 76 Oligonukleotidprimer OPN4

77. SEQ ID NO: 77 Oligonukleotidprimer OPN5

78. SEQ ID NO: 78 Oligonukleotidprimer OPN6

20 79. SEQ ID NO: 79 Oligonukleotidprimer OPN7

80. SEQ ID NO: 80 Oligonukleotidprimer OPN8

.25 81. SEQ ID NO: 81 Oligonukleotidprimer OPN9

82. SEQ ID NO: 82 Oligonukleotidprimer OPN10

83. SEQ ID NO: 83

30 Nukleinsäuresequenz kodierend für sRNAi4-dsRNA zur Suppression mehrerer Speicherproteine

84. SEQ ID NO: 84
35 Ribonukleinsäuresequenz kodierend für sRNAi4-dsRNA zur Suppression mehrerer Speicherproteine

85. SEQ ID NO: 85
Nukleinsäuresequenz kodierend für sRNAi8-dsRNA zur Suppression mehrerer Speicherproteine

40 86. SEQ ID NO: 86
Ribonukleinsäuresequenz kodierend für sRNAi8-dsRNA zur Suppression mehrerer Speicherproteine

45 87. SEQ ID NO: 87 Oligonukleotidprimer OPN11

57

88. SEQ ID NO: 88 Oligonukleotidprimer OP12

89. SEQ ID NO: 89 Oligonukleotidprimer OPN13

5 90. SEQ ID NO: 90 Oligonukleotidprimer OPN15

91. SEQ ID NO: 91 Oligonukleotidprimer OPN16

92. SEQ ID NO: 92 Oligonukleotidprimer OPN17

10 93. SEQ ID NO: 93 Nukleinsäuresequenz kodierend für *Arabidopsis thaliana* "globulin-like protein" (GenBank Acc.-No.: NM_119834)

15 94. SEQ ID NO: 94 Proteinsequenz kodierend für *Arabidopsis thaliana* "globulin-like protein" (Protein_id="NP_195388.1")

95. SEQ ID NO: 95 Nukleinsäuresequenz kodierend für *Glycine max* 7S Samenglobulin (GenBank Acc.-No.: U59425)

20 96. SEQ ID NO: 96 Proteinsequenz kodierend für *Glycine max* 7S Samenglobulin

25 97. SEQ ID NO: 97 Nukleinsäuresequenz kodierend für *Zea mays* 19kD Zein (GenBank Acc.-No.: E01144)

30 98. SEQ ID NO: 98 Proteinsequenz kodierend für *Zea mays* 19kD Zein

99. SEQ ID NO: 99 Nukleinsäuresequenz kodierend für *Zea mays* 19kD alpha Zein B1

35 35 (GenBank Acc.-No.: AF371269)

100. SEQ ID NO: 100 Proteinsequenz kodierend für *Zea mays* 19kD alpha Zein B1

40 101. SEQ ID NO: 101 Nukleinsäuresequenz kodierend für *Zea mays* 19kD alpha Zein B2

(GenBank Acc.-No.: AF371270)

102. SEQ ID NO: 102

45 Proteinsequenz kodierend für *Zea mays* 19kD alpha Zein B2

103. SEQ ID NO: 103

Nukleinsäuresequenz kodierend für Zea mays 22kD alpha-zein
(GenBank Acc.-No.: X61085)

5 104. SEQ ID NO: 104

Proteinsequenz kodierend für Zea mays 22kD alpha-zein

105. SEQ ID NO: 105

10 Nukleinsäuresequenz kodierend für Oryza sativa Prolamin
(GenBank Acc.-No.: AB016503)

106. SEQ ID NO: 106

Proteinsequenz kodierend für Oryza sativa Prolamin

15 107. SEQ ID NO: 107

Nukleinsäuresequenz kodierend für A.sativa Avenin (GenBank
Acc.-No.: M38446)

108. SEQ ID NO: 108

20 Proteinsequenz kodierend für A.sativa Avenin

109. SEQ ID NO: 109

Nukleinsäuresequenz kodierend für Hordeum vulgare C-Hordein
(GenBank Acc.-No.: M36941)

25

110. SEQ ID NO: 110

Proteinsequenz Teil 1 kodierend für Hordeum vulgare C-Hordein

111. SEQ ID NO: 111

30 Proteinsequenz Teil 2 kodierend für Hordeum vulgare C-Hordein

112. SEQ ID NO: 112

Nukleinsäuresequenz kodierend für Triticum aestivum LMW Glu-
tenin-1D1 (GenBank Acc.-No.: X13306)

35

113. SEQ ID NO: 113

Proteinsequenz kodierend für Triticum aestivum LMW Glute-
nin-1D1

40 114. SEQ ID NO: 114

Binärer Expressionsvektor für Agrobakterium vermittelte
Pflanzentransformation pSUN2-USP.

115. SEQ ID NO: 115

Partielle Nukleinsäuresequenz kodierend für Homogentisat-1,2-dioxygenase aus Brassica napus (HGD; EC-Nr.: 1.13.11.5)

5

116. SEQ ID NO: 116

Nukleinsäuresequenz kodierend für Homogentisat-1,2-dioxygenase aus Arabidopsis thaliana (HGD; EC-Nr.: 1.13.11.5)

10 117. SEQ ID NO: 117

Proteinsequenz kodierend für Homogentisat-1,2-dioxygenase aus Arabidopsis thaliana (HGD; EC-Nr.: 1.13.11.5)

118. SEQ ID NO: 118

15 Nukleinsäuresequenz kodierend für Maleylacetoacetatisomerase aus Arabidopsis thaliana (MAAI; EC-Nr.: 5.2.1.2.)

119. SEQ ID NO: 119

20 Proteinsequenz kodierend für Maleylacetoacetatisomerase aus Arabidopsis thaliana (MAAI; EC-Nr.: 5.2.1.2.)

120. SEQ ID NO: 120

Nukleinsäuresequenz kodierend für Fumarylacetoacetathiolase aus Arabidopsis thaliana (FAAH; EC-Nr.: 3.7.1.2)

25

121. SEQ ID NO: 121

Proteinsequenz kodierend für Fumarylacetoacetathiolase aus Arabidopsis thaliana (FAAH; EC-Nr.: 3.7.1.2)

30 122. SEQ ID NO: 122

Nukleinsäuresequenz kodierend für Suppressionskonstrukt 2 (p3300.1-Toc159-GFP-RNAi)

35 123. SEQ ID NO: 123

Oligonukleotidprimer OPN18

124. SEQ ID NO: 124

Oligonukleotidprimer OPN19

125. SEQ ID NO: 125

Oligonukleotidprimer OPN20

40

126. SEQ ID NO: 126

Oligonukleotidprimer OPN21

Abbildungen

45 1. Fig.1: Schematische Darstellung der Speicherprotein-Suppressionskonstrukte.

60

Insert aus Vektor pCR2.1-sRNAi4 (1) (vgl. Beispiel 2d) und pCR2.1-sRNAi8 (2) (vgl. Beispiel 2e) kodierend für eine die AtCru3-, AtCRB und At2S3-Expression supprimierende dsRNA.

5 In den beiden Konstrukten sind die "sense"-Ribonukleotidsequenzen und die komplementären "antisense"-Ribonukleotidsequenzen (symbolisiert durch auf dem Kopf stehende Buchstaben) für die einzelnen zu supprimierenden Zielgene (AtCru3; AtCRB, At2S3) unterschiedlich angeordnet. Schraffierte Bereiche (I1, 10 I2 etc.) stellen Intronsequenzen (Linker) dar.

2. Fig.2A-D: Symbolische Darstellung verschiedener dsRNAs in ihrer Sekundärstruktur.

15 S1, S2, ... S(n): "sense"-Ribonukleotidsequenz
AS1, AS2, ... AS(n): "antisense"-Ribonukleotidsequenz
I: Intronsequenz

20 Die Anordnung der einzelnen "sense"-Ribonukleotidsequenzen und "antisense"-Ribonukleotidsequenzen kann so erfolgen, dass zunächst alle "sense"-Ribonukleotidsequenzen aneinander gereiht werden und so quasi einen "sense"-Strang bilden, wodrauf dann alle "antisense"-Ribonukleotidsequenzen aneinander zu einem "antisense"-Strang zusammengefügt werden (A und C).

25 Alternativ kann die Anordnung der einzelnen "sense"-Ribonukleotidsequenzen und "antisense"-Ribonukleotidsequenzen so erfolgen, dass Paare von jeweils komplementären "sense"-Ribonukleotidsequenzen und "antisense"-Ribonukleotidsequenzen aneinander gefügt werden (B und D).

30 "sense"-Ribonukleotidsequenzen und "antisense"-Ribonukleotidsequenzen können direkt aneinandergesetzt sein (A und B) oder aber durch weitere Sequenzen beispielsweise Introns (I) von einander getrennt sein (C und D).

35 3. Fig.3A-C: Symbolische Darstellung verschiedener dsRNAs in ihrer Sekundärstruktur.

40 S1, S2, ... S(n): "sense"-Ribonukleotidsequenz
AS1, AS2, ... AS(n): "antisense"-Ribonukleotidsequenz
SP: "SPACER"
RE: Erkennungssequenz für Ribozym
R: Ribozym

61

"sense"-Ribonukleotidsequenzen und "antisense"-Ribonukleotidsequenzen können durch weitere Sequenzen ("SPACER"; SP) von einander getrennt sein (A). Der Spacer kann beispielsweise einer Erkennungssequenz für ein Ribozym sein. Das korrespondierende Ribozym kann separat exprimiert werden (B) oder aber auch ebenfalls von dem Spacer kodiert sein (C).

5 4. Fig.4: Abbildung des Suppressionskonstrukts mit den entsprechenden Restriktionsenzymeschnittstellen:

10

10 5. Fig.5A: Identifikation einer Pflanze, die den Albino-Phänotyp zeigt (links). Der Phänotyp ist identisch zur ppi2 Mutante, die Toc159 nicht mehr exprimieren kann. Als Kontrolle Pflanzen mit Wildtyp Phänotyp, die parallel gewachsen sind.

15

15 Fig. 5B: Fluoreszenz-Analyse der Pflanzen aus Fig.5A. Anregung der Fluoreszenz durch Licht im Wellenlängenbereich 470-490 nm. Es wurde dieselbe Vergrösserung gewählt wie in Fig.5A.

20

25

30

35

40

45

Beispiele

Allgemeine Methoden:

5 Alle Chemikalien, wenn nicht anders erwähnt, stammen von den Firmen Fluka (Buchs), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen). Restriktionsenzyme, DNA-modifizierende Enzyme und Molekularbiologie-Kits wurden von den Firmen Amersham-Pharmacia (Freiburg), Biometra (Göttingen), Roche 10 (Mannheim), New England Biolabs (Schwalbach), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Perkin-Elmer (Weiterstadt), Qiagen (Hilden), Stratagene (Amsterdam, Niederlande), Invitrogen (Karlsruhe) und Ambion (Cambridgeshire, United Kingdom). Die verwendeten Reagenzien wurden entsprechend der Angaben des Herstellers eingesetzt.

15 Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungs- 20 schritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarosegelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA werden 25 wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467).

30

Beispiel 1: Allgemeine Verfahren

Die Pflanze *Arabidopsis thaliana* repräsentiert ein Mitglied der höheren Pflanzen (Samenpflanzen). Diese Pflanze ist eng verwandt mit anderen Pflanzenarten aus der Familie der Cruciferen wie z.B. *Brassica napus*, aber auch mit anderen Pflanzenfamilien der Dikotyledonen. Aufgrund des hohen Grades an Homologie ihrer DNA-Sequenzen bzw. Polypeptidsequenzen kann *Arabidopsis thaliana* als 40 Modellpflanze für andere Pflanzenarten eingesetzt werden.

a) Anzucht von *Arabidopsis* Pflanzen

Die Pflanzen werden entweder auf Murashige-Skoog Medium mit 0,5 % Saccharose (Ogas et al. (1997) Science 277:91-94) oder auf Erde gezogen (Focks & Benning (1998) Plant Physiol 118:91-101). Um einheitliche Keimungs- und Blühzeiten zu erreichen, werden die

63

Samen nach Ausplattieren bzw. Ausstreuen auf Erde zwei Tage bei 4° C stratifiziert. Nach der Blüte werden die Schoten markiert. Entsprechend der Markierungen werden dann Schoten mit einem Alter von 6 bis 20 Tagen nach der Blüte geerntet.

5

b) Isolierung von total RNA und poly-A⁺ RNA aus Pflanzen

Für die Herstellung von Suppressionskonstrukten wird RNA bzw. polyA⁺ RNA isoliert. RNA wurde aus Schoten von *Arabidopsis* Pflanzen nach folgender Vorschrift isoliert: Schotenmaterial im Alter von 6 bis 20 Tage nach Blüte wurde geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Material wurde vor der weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. 75 mg des Materials wurde im gekühlten Mörser zu einem feinem Pulver gemahlen und mit 200 µL des Lysis-Puffers aus dem Ambion RNAqueos-Kit versetzt. Die Isolierung der totalen RNA wurde dann nach Herstellerangaben durchgeführt. Die RNA wurde mit 50 µL Elutionspuffer (Ambion) eluiert und die Konzentration durch Absorption einer 1 zu 100 verdünnten Lösung am Photometer (Eppendorf) bei 260 nm bestimmt. 40 µg/ml RNA entspricht dabei einer Absorption von 1. Die RNA-Lösungen wurden mit RNase freiem Wasser auf eine Konzentration von 1 µg/µL eingestellt. Die Konzentrationen wurden durch Agarosegelektrophorese überprüft. Zur Isolierung von polyA⁺ RNA wurde oligo(dT)-Zellulose von Amersham Pharmacia nach Herstellerangaben verwendet. RNA bzw. polyA⁺ RNA wurde bei -70°C gelagert.

c) Konstruktion der cDNA-Bank

Zur Konstruktion der cDNA-Bank aus *Arabidopsis* Schoten-RNA wurde die Erststrangsynthese unter Verwendung von Reverser Transkriptase aus Maus-Leukämie-Virus (Clontech) und Oligo-d(T)-Primern, die Zweitstrangsynthese durch Inkubation mit DNA-Polymerase I, Klenow-Enzym und RNase H-Spaltung bei 12°C (2 Std.), 16°C (1 Std.) und 22°C (1 Std.) erzielt. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 65°C (10 min) gestoppt und anschließend auf Eis überführt. Doppelsträngige DNA-Moleküle wurde mit T4-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim) bei 37°C (30 min) mit glatten Enden versehen. Die Nukleotide wurden durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Sephadex-G50-Zentrifugiersäulen entfernt. EcoRI/XhoI-Adapter (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) wurden mittels T4-DNA-Ligase (Roche, 12°C, über Nacht) an die cDNA-Enden ligiert, mit XhoI nachgeschnitten und durch Inkubation mit Polynukleotidkinase (Roche, 37°C, 30 min) phosphoryliert. Dieses Gemisch wurde der Trennung auf einem Low-Melting-Agarose-Gel unterworfen. DNA-Moleküle über 300 Basenpaaren wurden aus dem Gel eluiert, Phenol-extrahiert, auf Elutip-D-Säulen (Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland) konzentriert und an Vektorarme ligiert und in lambda-ZAPII-Phagen

64

oder lambda-ZAP-Express-Phagen unter Verwendung des Gigapack Gold-Kits (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verpackt, wobei Material des Herstellers verwendet und seine Anweisungen befolgt wurden.

5

d) Isolierung von genomischer DNA aus Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* oder *Brassica napus* (CTAB-Methode)

Zur Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* oder *Brassica napus* werden ca. 0,25 g Blattmaterial junger Pflanzen im vegetativen Stadium in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsernt. Das pulverisierte Pflanzenmaterial wird zusammen mit 1 ml 65°C-warmem CTAB I-Puffer (CTAB: Hexadecyltrimethylammoniumbromid, auch genannt Cetyltrimethylammoniumbromid; Sigma Kat.-Nr.: H6269) und 20 µl β-Mercaptoethanol in einen vorgewärmten zweiten Mörser gegeben und nach vollständiger Homogenisierung wird der Extrakt in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und für 1 h bei 65°C unter regelmäßiger, vorsichtiger Durchmischung inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird der Ansatz mit 1 ml Chloroform/Octanol (24:1, mit 1M Tris/HCl, pH 8,0 ausgeschüttelt) durch langsames Invertieren extrahiert und zur Phasentrennung für 5 min bei 8,500 rpm (7,500 x g) und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wird die wässrige Phase erneut mit 1 ml Chloroform/Octanol extrahiert, zentrifugiert und durch Invertieren mit 1/10 Volumen auf 65°C vorgewärmtem CTAB II-Puffer sorgfältig gemischt. Anschließend wird der Ansatz durch vorsichtiges Schwenken mit 1 ml Chloroform/Octanol-Gemisch (siehe oben) versetzt und zur erneuten Phasentrennung für 5 min bei 8,500 rpm (7,500 x g) und Raumtemperatur zentrifugiert. Die wässrige untere Phase wird in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und die obere organische Phase wird in einem frischen Eppendorf-Gefäß erneut für 15 min bei 8,500 rpm (7,500 x g) und Raumtemperatur zentrifugiert. Die hieraus resultierende wässrige Phase wird mit der wässrigen Phase des vorherigen Zentrifugationsschrittes vereinigt und der gesamte Ansatz mit exakt demselben Volumen vorgewärmtem CTAB III-Puffer versetzt. Es folgt eine Inkubation bei 65°C, bis die DNA in Flocken ausfällt. Dies kann bis zu 1 h dauern oder durch Inkubation bei 37°C über Nacht erfolgen. Das aus dem anschließenden Zentrifugationsschritt (5 min, 2000 rpm (500 x g), 4°C) resultierende Sediment wird mit 250 µl auf 65°C vorgewärmtem CTAB IV-Puffer versetzt und für mindestens 30 min bzw. bis zur vollständigen Auflösung des Sediments bei 65°C inkubiert. Anschließend wird die Lösung zur Fällung der DNA mit 2,5 Volumina eiskaltem Ethanol vermischt und für 1h bei -20°C inkubiert. Alternativ kann der Ansatz mit 0,6 Volumina Isopropanol vermischt und ohne weitere Inkubation sofort für 15 min bei 8,500 rpm (7,500 x g) und 4°C zentrifugiert werden. Die sedimentierte DNA wird durch

65

Invertieren des Eppendorf-Gefäßes zweimal mit je 1 ml 80%igem eiskaltem Ethanol gewaschen, nach jedem Waschschritt erneut zentrifugiert (5 min, 8,500 rpm (7,500 x g), 4°C) und anschließend für ca. 15 min luftgetrocknet. Abschließend wird die DNA in

5 100 µl TE mit 100 µg/ml RNase resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA Lösung ist nach einer weiteren Inkubationsphase über Nacht bei 4°C homogen und kann für weiterführende Experimente verwendet werden.

10 Lösungen für CTAB:

Lösung I (für 200 ml):

100 mM Tris/HCl pH 8,0 (2,42 g)

1,4 M NaCl (16,36 g)

15 20 mM EDTA (8,0 ml von 0,5 M Stammlösung)
2 % (w/v) CTAB (4,0 g)

Jeweils vor der Verwendung werden frisch zugesetzt:

2 % β-Mercaptoethanol (20 µl für 1 ml Lösung I).

20 Lösung II (für 200 ml):
0,7 M NaCl (8,18 g)

10 % (w/v) CTAB (20 g)

25 Lösung III (für 200 ml):

50 mM Tris/HCl pH 8,0 (1,21 g)

10 mM EDTA (4 ml 0,5 M von 0,5 M Stammlösung)

1 % (w/v) CTAB (2,0 g)

30 Lösung IV (High-salt TE) (für 200 ml):

10 mM Tris/ HCl pH 8,0 (0,242 g)

0,1 mM EDTA (40 µl 0,5 M Stammlösung)

1 M NaCl (11, 69 g)

35 Chloroform/Octanol (24:1) (für 200 ml):

192 ml Chloroform

8 ml Octanol

Die Mischung wird 2x mit 1 M TrisHCl pH 8,0 ausgeschüttelt und vor Licht geschützt gelagert.

40 Beispiel 2: Herstellung von Suppressionskonstrukten

Ausgehend von der genomischer *Arabidopsis thaliana* DNA oder cDNA wurden über PCR mittels der aufgeführten Oligonukleotide folgende

45 Fragmente von Speicherproteinsequenzen amplifiziert. Dabei kam nachfolgendes PCR Protokoll zum Einsatz:

66

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

5,00 µL Template cDNA oder genomische DNA (ca. 1 µg)
5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25 mM MgCl₂
5 5,00 µL 2mM dNTP
1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)
0,50 µL Advantage-Polymerase (Clontech)

PCR-Programm: Anfangsdenaturierung für 2 min bei 95°C, dann 35 Zy-
10 klen mit 45 sec 95°C, 45 sec 55°C und 2 min 72°C. Abschliessende Extension von 5 min bei 72°C.

a) Ausgangsvektor pCR2.1-AtCRU3-RNAi

15 Aus genomischer Arabidopsis thaliana DNA wird mit nachfolgendem Oligonukleotid-Primerpaar ein Exonbereich mit dem vollständigen anschließenden Intron einschließlich der an das Intron anschließenden Spleiß-Akzeptorsequenz des 12S Speicherprotein AtCRU3 (Basenpaar 1947 bis 2603 der Sequenz mit der GenBank Acc.-No:
20 U66916) amplifiziert:

ONP1 (SEQ ID NO: 134):

5'-ATAAGAATGCGGCCGCGTGTCCATTGGCCGGAAACAAAC-3'

25 ONP2 (SEQ ID NO: 135):

5'-CCCGGATCCTCTGTAAACATTGACAAAACATG-3'

Das PCR-Produkt wird in den pCR2.1-TOPO Vektor (Invitrogen) gemäss Herstellerangaben kloniert, resultierend in dem pCR2.1-1
30 Vektor und die Sequenz überprüft.

Für die den antisense-Strang der dsRNA kodierende Sequenz wird aus Arabidopsis thaliana cDNA lediglich das gleiche Exon wie oben (Basenpaar 1947 bis 2384) mit dem nachfolgenden Primerpaar amplifiziert:

ONP3 (SEQ ID NO: 136):

5'ATAAGAATGCGGCCGCGTGTCCATTGGCCGGAAACAAAC-3'

40 ONP4 (SEQ ID NO: 137):

5' ATAAGAATGCGGCCGCGGATCCACCCCTGGAGAACGCCACGAGTG-3'

Das PCR-Produkt wird in den pCR2.1-TOPO Vektor (Invitrogen) gemäss Herstellerangaben kloniert, resultierend in dem pCR2.1-2
45 Vektor und die Sequenz überprüft.

0,5 µg von Vektor pCR2.1-1 werden mit dem Restriktionsenzym BamHI (New England Biolabs) für 2 Stunden nach Herstellerangaben inkubiert und dann für 15 min mit alkalischer Phosphatase (New England Biolabs) dephosphoryliert. Der so präparierte Vektor (1 µL)
5 wird dann mit dem aus Vektor pCR2.1-2 gewonnenen Fragment ligiert. Dazu werden 0,5 µg von Vektor pCR2.1-2 2 Stunden mit BamHI (New England Biolabs) verdaut und die DNA-Fragmente per Gelelektrophorese aufgetrennt. Das neben dem Vektor (3,9 kb) entstandene 489 bp grosse Stück wird aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem
10 "Gelpurification"-Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit 50 µL Elutionspuffer eluiert. 10 µL des Eluats werden mit Vektor pCR2.1-1 (s.o.) über Nacht bei 16°C ligiert (T4 Ligase, New England Biolabs). Die Ligationsprodukte werden dann in TOP10 Zellen (Stratagene) nach Herstellerangaben transformiert und ent-
15 sprechend selektioniert. Positive Klone werden mit dem Primerpaar ONP1 und ONP2 durch PCR verifiziert. Der erhaltene Vektor wird pCR2.1-AtCRU3-RNAi genannt. Die für die dsRNA kodierende Nukleinsäuresequenz ist durch SEQ ID NO: 105 beschrieben.

20 b) Ausgangsvektor pCR2.1-AtCRB-RNAi

Mit nachfolgendem Oligonukleotid-Primerpaar wird ein Exonbereich des 12S Speicherprotein AtCRB (SEQ ID NO: 117 bzw. 118; Basenpaar 601 bis 1874 der Sequenz mit der GenBank Acc.-No: M37248) aus 25 Arabidopsis thaliana cDNA amplifiziert:

ONP5 (SEQ ID NO: 138):

5' ATAAGAATGCAGGCCGGATCCCTCAGGGTCTTCAGCCACT-3'

30 ONP6 (SEQ ID NO: 139):

5' -CCGCTCGAGTTACGGATGGAGCCACGAAG-3'

Das PCR-Produkt wird in den pCR2.1-TOPO Vektor (Invitrogen) gemäss Herstellerangaben kloniert, resultierend in dem pCR2.1-3 35 Vektor und die Sequenz überprüft.

Für den als Linker fungierenden Bereich wird aus Arabidopsis thaliana genomicischer DNA ein Intron mit den entsprechenden Spliceakzeptor und -donorsequenzen der flankierenden Exons (Basenpaar 1874 bis 2117 der Sequenz mit der GenBank Acc.-No: M37248) mit 40 dem nachfolgenden Primerpaar amplifiziert:

ONP7 (SEQ ID NO: 140):

5' -CCGCTCGAGGTAAAGCTAACAAATCTTAG-3'

45 ONP8 (SEQ ID NO: 141):

5' -ACGCGTCGACGCGTTCTGCGTGCAAGATATT-3'

Das PCR-Produkt wird in den pCR2.1-TOPO Vektor (Invitrogen) gemäss Herstellerangaben kloniert, resultierend in dem pCR2.1-4 Vektor und die Sequenz überprüft.

- 5 Das Konstrukt für AtCRB wird in einer ähnlichen Strategie wie für AtCRU3 erläutert, erstellt. Vektor pCR2.1-3 wird mit XhoI (New England Biolabs) für 2 Stunden inkubiert und dephosphoryliert (alkalische Phosphatase, New England Biolabs). Vektor pCR2.1-4 wird ebenfalls mit XhoI in derselben Weise inkubiert und die Gelfragmente per Gelelektrophorese aufgetrennt. Die entsprechenden Fragmente werden in der unter AtCRU3 beschriebenen Art und Weise aufgereinigt und ligiert, resultierend nach Bakterientransformation in dem Vektor pCR2.1-AtCRB Exon/Intron. Dieser Vektor wird für 2 Stunden mit XbaI (NEB), anschliessend für 15 min mit Klenow-Fragment (NEB), dann für 2 Stunden mit SalI inkubiert und zuletzt 15 min mit alkalischer Phosphatase (NEB) behandelt. Parallel wird der Vektor pCR2.1-3 mit BamHI (NEB); dann 15 min mit Klenow-Fragment und anschliessend 2 Stunden mit XhoI (NEB) inkubiert. Das Exon-Fragment von AtCRB wird nach Gelelektrophorese isoliert, gereinigt und zur Ligation eingesetzt. Beide Fragmente wurden dann ligiert und der Vektor pCR2.1-AtCRB-RNAi resultierte. Der erhaltene Vektor wird pCR2.1-AtCRB-RNAi genannt. Die für die dsRNA kodierende Nukleinsäuresequenz ist durch SEQ ID NO: 107 beschrieben.
- 10
- 15
- 20
- 25 c) Ausgangsvektor pCR2.1-At2S3-RNAi.

- Mit nachfolgendem Oligonukleotid-Primerpaar wird ein Exonbereich des 2S Speicherprotein At2S3 (SEQ ID NO: 3 bzw. 4; Basenpaar 212 bis 706 der Sequenz mit der GenBank Acc.-No: M22035) amplifiziert:

ONP9 (SEQ ID NO: 142):

5'-ATAAGAATGCGGCCGGATCCATGGCTAACAAAGCTTCCCTCGTC-3'

- 35 ONP10 (SEQ ID NO: 143):
- 5'-ATAAGAATGCGGCCGGATCCCTAGTAGTAAGGAGGGAAGAAAG-3'

- Das PCR-Produkt wird in den pCR2.1-TOPO Vektor (Invitrogen) gemäss Herstellerangaben kloniert, resultierend in dem pCR2.1-5 Vektor und die Sequenz überprüft. Für den als Linker fungierenden Bereich wird das gleiche Intron wie unter b) mit den Primern OPN 7 und OPN 8 amplifiziert eingesetzt.
- 40

- 45 Das Konstrukt für At2S3 wird in einer ähnlichen Strategie wie für AtCRU3 erläutert, erstellt. Vektor pCR2.1-5 wird mit XhoI (New England Biolabs) für 2 Stunden inkubiert und dephosphoryliert (alkalische Phosphatase, New England Biolabs). Vektor

pCR2.1-3 werden ebenfalls mit XhoI in derselben Weise inkubiert und die Gelfragmente per Gelelektrophorese aufgetrennt. Die entsprechenden Fragmente werden in der unter AtCRU3 beschriebenen Art und Weise aufgereinigt und ligiert, resultierend nach Bakterientransformation in dem Vektor pCR2.1-At2S3 Exon/Intron. Dieser Vektor wird für 2 Stunden mit SalI (NEB), anschliessend für 15 min mit Klenow-Fragment (NEB) inkubiert und zuletzt 15 min mit alkalischer Phosphatase (NEB) behandelt. Parallel wird der Vektor pCR2.1-5 mit BamHI (NEB) und dann 15 min mit Klenow-Fragment inkubiert. Das Exon-Fragment von At2S3 wird nach Gelelektrophorese isoliert, gereinigt und zur Ligation eingesetzt. Beide Fragmente werden dann ligiert und der Vektor pCR2.1-At2S3-RNAi resultierte. Die für die dsRNA kodierende Nukleinsäuresequenz ist durch SEQ ID NO: 109 beschrieben.

15

d) Herstellung von Super-Suppressionskonstrukt 1

Die Vektoren pCR2.1-AtCRU3-RNAi und pCR2.1-4 (siehe oben) werden mit den Restriktionsenzymen XhoI und SalI für 2 Stunden bei 37°C inkubiert, die DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und sowohl der Vektor als auch das PCR-Insert aus pCR2.1-4 ausgeschnitten und mit dem "Gelpurification"-Kit von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit 50 µL Elutionspuffer eluiert. Vom Vektor wird 1 µL, vom PCR-Insert aus pCR2.1-4 8 µL der Eluate für die Ligation eingesetzt, resultierend in dem Konstrukt pCR2.1-sRNAi1. Dieser Vektor wird für 2 Stunden mit dem Restriktionsenzym XhoI und dann für 15 min mit Klenow-Fragment inkubiert.

30 Der Vektor pCR2.1-AtCRB-RNAi (siehe oben) wird mit dem Enzym EcoRI für 2 Stunden inkubiert und ebenfalls 15 min mit Klenow-Fragment behandelt. Beide Inkubationsansätze werden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und jeweils der Vektor (pCR2.1-sRNAi1) bzw. das Insert (aus pCR2.1-AtCRB-RNAi) aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA-Fragmente wie oben beschrieben aufgereinigt. Für die Ligation werden 1 µL des Eluates vom Vektor und 8 µL des Eluates vom Insert eingesetzt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Das resultierende Konstrukt wird mit pCR2.1-sRNAi2 bezeichnet. Der resultierende Vektor wird mit dem Enzym XbaI und anschliessend mit Klenow-Fragment inkubiert. Der Vektor pCR2.1-4 wird mit den Enzymen EcoRV und XbaI und anschliessend mit Klenow-Fragment inkubiert. Nach Gelelektrophorese und -reinigung wird das Fragment aus pCR2.1-4 mit dem Vektor pCR2.1-sRNAi2 ligiert, resultierend in dem Konstrukt pCR2.1-sRNAi3. Der resultierende Vektor wird dann mit dem Enzym ApaI für 2 Stunden und dann mit Klenow-Fragment für 15 min inkubiert. Als Insert wird der Vektor pCR2.1-At2S3-RNAi mit dem Enzym EcoRI für 2 Stunden und dann mit

70

Klenow-Fragment für 15 min inkubiert. Nach Gelelektrophorese und -reinigung werden die Eluate ligiert, resultierend in dem Vektor pCR2.1-sRNAi4. Aus diesem Vektor wird dann das sRNAi4-Fragment (SEQ ID NO: 144; vgl. Fig. 1(1)), kodierend für die super-suppressierende dsRNA, durch Inkubation mit HindIII und PvuI ausgeschnitten und in den binären Vektor pSUN-USP (SEQ ID NO: 179) ligiert. Das Konstrukt dient der gleichzeitigen Suppression von *Arabidopsis thaliana* Speicherproteinen CRB (SEQ ID NO: 4), CRU3 (SEQ ID NO: 112) und At2S3 (SEQ ID NO: 118).

10

Der verwendete Vektor pSUN-USP ist ein binärer Vektor zur Pflanzentransformation auf Basis von pBinAR (Höfgen und Willmitzer (1990) Plant Science 66: 221-230). Eine gewebespezifische Expression im Samen lässt sich unter Verwendung des gewebespezifischen 15 Promotors USP-Promotors erzielt.

e) Herstellung von Super-Suppressionskonstrukt 2

Ausgehend von *Arabidopsis thaliana* cDNA wird ein Fragment aus dem 20 Speicherprotein AtCRU3 (SEQ ID NO: 111, 112) mit dem nachfolgenden Oligonukleotid-Primerpaar unter den in Beispiel 2 angegebenen PCR-Bedingungen amplifiziert:

OPN 11: 5'-AAAAGGCCTGTGTTCCATTTGGCCGGAAACAAC-3' (SEQ ID NO: 148)

25 OPN 12: 5'-AAAGATATCACCTGGAGAACGCCACGAGTG-3' (SEQ ID NO: 149).

Das erhaltene Fragment wird in den Vektor pCR2.1-TOPO Vektor (In-vitrogen) gemäss Herstellerangaben kloniert, resultierend in den pCR2.1-6 und die Sequenzen überprüft.

30

Ausgehend von *Arabidopsis thaliana* cDNA wird ein Fargment aus dem Speicherprotein At2S3 (SEQ ID NO: 3, 4) mit dem nachfolgenden Oligonukleotid-Primerpaar unter den in Beispiel 2 angegebenen PCR-Bedingungen amplifiziert:

35

OPN 13: 5'-AAAAGGCCTATGGCTAACAAAGCTTCCCTCGTC-3' (SEQ ID NO: 150)

OPN 14: 5'-AAAGATATCCTAGTAGTAAGGAGGAAAGAAG-3' (SEQ ID NO: 151).

Das erhaltene Fragment wird in den Vektor pCR2.1-TOPO Vektor (In-vitrogen) gemäss Herstellerangaben kloniert, resultierend in den pCR2.1-7 und die Sequenzen überprüft.

Aus den pCR2.1-3, pCR2.1-4 (siehe Beispiel 2) und pCR2.1-6 und pCR2.1-7 werden dann die Konstrukte folgendermassen zusammen 45 ligiert: Der Vektor pCR2.1-3 wird 2 Stunden mit EcoRV inkubiert und anschliessend 15 min mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Der Vektor pCR2.1-6 wird mit den Enzymen StuI und EcoRV

für 2 Stunden inkubiert und das PCR-Insert über Gelelektrophorese und -reinigung isoliert. Vektor pCR2.1-3 und Insert aus pCR2.1-6 werden dann über Nacht bei 4°C ligiert, resultierend in dem Konstrukt pCR2.1-sRNAi5. Dieser Vektor wird dann mit EcoRV inkubiert
 5 und dephosphoryliert und mit dem StuI/ EcoRV inkubierten und gelaufgereinigten Fragment aus pCR2.1-7 ligiert, resultierend in dem Konstrukt pCR2.1-sRNAi6. Dieser Vektor wird dann mit XhoI inkubiert und dephosphoryliert. Der Vektor pCR2.1-4 wird mit SalI und XhoI inkubiert und das Insert aus pCR2.1-4 mit dem vorbereitet
 10 Vektor pCR2.1-sRNAi6 ligiert, resultierend in dem Konstrukt pCR2.1-sRNAi7. Ausgehend von pCR2.1-sRNAi7 wird eine PCR mit den nachfolgenden Primerpaar unter den in Beispiel 2 gegebenen Bedingungen durchgeführt:

15 OPN 15: 5' CCGCTCGAGCTCAGGGTCTTTCTTGCCCACT (SEQ ID NO: 152)
OPN 16: 5'-CCGGTCGACCTAGTAGTAAGGAGGGAAGAAAG (SEQ ID NO: 153).

Das resultierende PCR-Produkt wird mit den Enzymen XhoI und SalI inkubiert. Das Fragment wird dann in den Vektor pCR2.1-sRNAi7
 20 (inkubiert mit XhoI) ligiert, resultierend in dem Konstrukt pCR2.1-sRNAi8. Aus diesem Vektor wird dann das sRNAi8-Fragment (SEQ ID NO: 146; vgl. Fig. 1(2)), kodierend für die super-supprimierende dsRNA, durch Inkubation mit HindIII und XbaI ausgeschnitten und in den binären Vektor pSUN-USP (SEQ ID NO: 179) li-
 25 giert. Das Konstrukt dient der gleichzeitigen Suppression von *Arabidopsis thaliana* Speicherproteinen CRB (SEQ ID NO: 4), CRU3 (SEQ ID NO: 112) und At2S3 (SEQ ID NO: 118).

Beispiel 3: Transformation von Agrobacterium
30

Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation kann zum Beispiel unter Verwendung der *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme GV3101 (pMP90) (Koncz und Schell (1986) Mol Gen Genet 204: 383-396) oder LBA4404 (Clontech) durchgeführt werden. Die Transfor-
 35 mation kann durch Standard-Transformationstechniken durchgeführt werden (Deblaere et al. (1984) Nucl Acids Res 13:4777-4788).

Beispiel 4: Pflanzentransformation

40 Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation kann unter Verwendung von Standard-Transformations- und Regenerationstechniken durchgeführt werden (Gelvin, Stanton B., Schilperoort, Robert A., Plant Molecular Biology Manual, 2. Aufl., Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995, in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P
45 ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R., Thompson, John E., Methods

in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton: CRC Press, 1993, 360 S., ISBN 0-8493-5164-2).

Die Transformation mittels Agrobacterium von *Arabisopsis thaliana* wird durch die Methode nach Bechthold et al., 1993 (C.R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie., 316, 1194-1199) durchgeführt. Beispielsweise kann Raps mittels Kotyledonen- oder Hypokotyltransformation transformiert werden (Moloney et al., Plant Cell Report 8 (1989) 238-242; De Block et al., Plant Physiol. 91 10 (1989) 694-701). Die Verwendung von Antibiotika für die Agrobacterium- und Pflanzenselektion hängt von dem für die Transformation verwendeten binären Vektor und Agrobacterium-Stamm ab. Die Rapsselektion wird gewöhnlich unter Verwendung von Kanamycin als selektierbarem Pflanzenmarker durchgeführt.

15 Der Agrobacterium-vermittelte Gentransfer in Lein (*Linum usitatissimum*) lässt sich unter Verwendung von beispielsweise einer von Mlynarova et al. (1994) Plant Cell Report 13:282-285 beschriebenen Technik durchführen.

20 Die Transformation von Soja kann unter Verwendung von beispielsweise einer in EP-A-0 0424 047 (Pioneer Hi-Bred International) oder in EP-A-0 0397 687, US 5,376,543, US 5,169,770 (University Toledo) beschriebenen Technik durchgeführt werden.

25 Die Pflanzentransformation unter Verwendung von Teilchenbeschuß, Polyethylenglycol-vermittelter DNA-Aufnahme oder über die Siliziumcarbonatfaser-Technik ist beispielsweise beschrieben von Freeling und Walbot "The maize handbook" (1993) ISBN 30 3-540-97826-7, Springer Verlag New York).

Beispiel 5: Untersuchung der Expression eines rekombinanten Genproduktes in einem transformierten Organismus

35 Die Aktivität eines rekombinanten Genproduktes im transformierten Wirtsorganismus wurde auf der Transkriptions- und/oder der Translationsebene gemessen.

Ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der Menge an Transkription des Gens (ein Hinweis auf die Menge an RNA, die für die Translation des Genproduktes zur Verfügung steht) ist die Durchführung eines Northern-Blots wie unten ausgeführt (als Bezugsstelle siehe Ausubel et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York, oder den oben erwähnten Beispielteil), wobei ein Primer, der so gestaltet ist, daß er an das Gen von Interesse bindet, mit einer nachweisbaren Markierung (gewöhnlich radioaktiv oder chemilumineszent) markiert wird, so daß, wenn die

Gesamt-RNA einer Kultur des Organismus extrahiert, auf einem Gel aufgetrennt, auf eine stabile Matrix transferiert und mit dieser Sonde inkubiert wird, die Bindung und das Ausmaß der Bindung der Sonde das Vorliegen und auch die Menge der mRNA für dieses Gen 5 anzeigt. Diese Information zeigt den Grad der Transkription des transformierten Gens an. Zelluläre Gesamt-RNA kann aus Zellen, Geweben oder Organen mit mehreren Verfahren, die alle im Fachgebiet bekannt sind, wie zum Beispiel das von Bormann, E.R., et al. (1992) Mol. Microbiol. 6:317-326 beschriebene, präpariert werden.

10

Northern-Hybridisierung:

Für die RNA-Hybridisierung wurden 20 µg Gesamt-RNA oder 1 µg poly(A)⁺-RNA mittels Gelelektrophorese in Agarosegelen mit einer Stärke von 1,25 % unter Verwendung von Formaldehyd, wie be- 15 schrieben in Amasino (1986, Anal. Biochem. 152, 304) aufgetrennt, mittels Kapillaranziehung unter Verwendung von 10 x SSC auf positi- tiv geladene Nylonmembranen (Hybond N+, Amersham, Braunschweig) übertragen, mittels UV-Licht immobilisiert und 3 Stunden bei 68°C unter Verwendung von Hybridisierungspuffer (10 % Dextransulfat 20 Gew./Vol., 1 M NaCl, 1 % SDS, 100 mg Heringssperma-DNA) vorhybridisiert. Die Markierung der DNA-Sonde mit dem Highprime DNA labeling-Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) erfolgte während der Vorhybridisierung unter Verwendung von alpha-³²P-dCTP (Amersham Pharmacia, Braunschweig, Deutschland). Die Hybridisierung wurde nach 25 Zugabe der markierten DNA-Sonde im gleichen Puffer bei 68°C über Nacht durchgeführt. Die Waschschritte wurden zweimal für 15 min unter Verwendung von 2 X SSC und zweimal für 30 min unter Verwen- dung von 1 X SSC, 1 % SDS, bei 68°C durchgeführt. Die Exposition der verschlossenen Filter wurde bei -70°C für einen Zeitraum von 1 30 bis 14 T durchgeführt.

Zur Untersuchung des Vorliegens oder der relativen Menge an von dieser mRNA translatiertem Protein können Standardtechniken, wie ein Western-Blot, eingesetzt werden (siehe beispielsweise Ausubel 35 et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York). Bei diesem Verfahren werden die zellulären Gesamt-Proteine extrahiert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Matrix, wie Nitrozellulose, übertragen und mit einer Sonde, wie einem Antikörper, der spezifisch an das gewünschte Protein bin- 40 det, inkubiert. Diese Sonde ist gewöhnlich mit einer chemilumi- neszenten oder kolorimetrischen Markierung versehen, die sich leicht nachweisen lässt. Das Vorliegen und die Menge der beobach- teten Markierung zeigt das Vorliegen und die Menge des gewünsch- ten, in der Zelle vorliegenden mutierten Proteins an.

Beispiel 6: Analyse der Auswirkung der rekombinanten Proteine auf die Produktion des gewünschten Produktes

Die Auswirkung der genetischen Modifikation in Pflanzen, Pilzen,
5 Algen, Ciliaten oder auf die Produktion einer gewünschten Verbin-
dung (wie einer Fettsäure) kann bestimmt werden, indem die modi-
fizierten Mikroorganismen oder die modifizierte Pflanze unter ge-
eigneten Bedingungen (wie den vorstehend beschriebenen) gezüchtet
werden und das Medium und/oder die zellulären Komponenten auf die
10 erhöhte Produktion des gewünschten Produktes (d.h. von Lipiden
oder einer Fettsäure) untersucht wird. Diese Analysetechniken
sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünn-
schichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymati-
tische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromato-
graphie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (siehe
15 beispielsweise Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd.
A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et
al., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory
Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm et
20 al. (1993) Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III: "Product recovery
and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A., et
al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechno-
logy, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F., und Cabral, J.M.S.
(1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley
25 and Sons; Shaeiwitz, J.A., und Henry, J.D. (1988) Biochemical Se-
parations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry,
Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J.
(1989) Separation and purification techniques in biotechnology,
Noyes Publications).

30

Neben den oben erwähnten Verfahren werden Pflanzenlipide aus
Pflanzenmaterial wie von Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 96 (22):12935-12940, und Browne et al. (1986) Analytic
Biochemistry 152:141-145, beschrieben extrahiert. Die qualitative
35 und quantitative Lipid- oder Fettsäureanalyse ist beschrieben
bei Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/
Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie,
William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide -
Ayr, Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 S. (Oily
40 Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford:
Pergamon Press, 1 (1952) - 16 (1977) u.d.T.: Progress in the Che-
mistry of Fats and Other Lipids CODEN.

Zusätzlich zur Messung des Endproduktes der Fermentation ist
45 es auch möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu ana-
lysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet
werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die Gesamteffizienz

der Produktion der Verbindung zu bestimmen. Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (z.B. Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums,
5 Analyse der Produktion üblicher Metabolite von Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes und P.F. Stanbury, Hrsgb., IRL Press, S. 103-129; 131-163 und 165-192
10 (ISBN: 0199635773) und darin angegebenen Literaturstellen beschrieben.

Ein Beispiel ist die Analyse von Fettsäuren (Abkürzungen: FAME, Fettsäuremethylester; GC-MS, Gas-Flüssigkeitschromatographie-Masspektrometrie; TAG, Triacylglycerin; TLC, Dünnschichtchromatographie).

Der unzweideutige Nachweis für das Vorliegen von Fettsäureprodukten kann mittels Analyse rekombinanter Organismen nach Standard-
20 Analyseverfahren erhalten werden: GC, GC-MS oder TLC, wie verschiedentlich beschrieben von Christie und den Literaturstellen darin (1997, in: Advances on Lipid Methodology, Vierte Aufl.: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren, Lipide 33:343-353).

25 Das zu analysierende Material kann durch Ultraschallbehandlung, Mahlen in der Glasmühle, flüssigen Stickstoff und Mahlen oder über andere anwendbare Verfahren aufgebrochen werden. Das Material muss nach dem Aufbrechen zentrifugiert werden. Das Sediment wird in Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert, gefolgt von Extraktion in 0,5 M Schwefelsäure in Methanol mit 2 % Dimethoxypropan für 1 Std. bei 90°C, was zu hydrolysierten Öl- und Lipidverbindungen führt, die transmethylierte Lipide ergeben. Diese Fettsäuremethylester werden in Petrolether extrahiert und schließlich einer GC-Analyse unter Verwendung einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 mikrom, 0,32 mm) bei einem Temperaturgradienten zwischen 170°C und 240°C für 20 min und 5 min bei 240°C unterworfen. Die Identität der erhaltenen Fettsäuremethylester muss unter Verwendung von Standards, die aus kommerziellen Quellen erhältlich sind (d.h. Sigma), definiert werden.

Für die Öl-Analyse der mit den Suppressionskonstrukten transformierten *Arabidopsis* Pflanzen wird folgendes Protokoll angewendet:

76

Die Extraktion der Lipide aus Samen wird nach der Methode von Bligh & Dyer (1959) Can J Biochem Physiol 37:911 durchgeführt. Dazu werden 5 mg Arabidopsis Samen in 1,2 ml Qiagen-Microtubes (Qiagen, Hilden) auf einer Sartorius (Göttingen) Mikrowaage abge-
5 wogen. Das Samenmaterial wird mit 500 μ L Chloroform/Methanol (2:1; enthält Mono-C17-glycerin von Sigma als internen Standard) in der Rätschmühle MM300 der Firma Retsch (Haan) homogenisiert und 20 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 500 μ L 50 mM Kalium-phosphatpuffer pH 7,5 erfolgt die Phasentrennung. Von der organi-
10 schen Phase werden 50 μ L abgenommen, mit 1500 μ L Chloroform verdünnt und 5 μ L auf die Kapillaren Chromarods SIII der Firma Ia-
troscan (SKS, Bechenheim) aufgetragen. Nach Auftrag der Proben werden diese für 15 min in einer Dünnschichtkammer, die gesättigt ist mit 6:2:2 Chloroform: Methanol: Toluol in einem ersten
15 Schritt aufgetrennt. Nach Ablauf der Zeit werden die Kapillaren 4 min bei Raumtemperatur getrocknet und dann für 22 min in eine Dünnschichtkammer, die gesättigt ist mit 7:3 n-Hexan:Dieethyle-
ther gestellt. Nach einem weiteren Trocknungsschritt für 4 min bei Raumtemperatur werden die Proben in einem Iatroskan MK-5
20 (SKS, Bechenheim) entsprechend Fraser & Taggart, 1988 J. Chroma-
togr. 439:404 analysiert. Folgende Parameter wurden für die Mes-
sungen eingestellt: Slice width 50 msec, Threshold 20 mV, Noise 30, Skim ratio 0. Die Quantifizierung der Daten erfolgte anhand des internen Standards Mono-C17-glycerin (Sigma) sowie einer er-
25 stellten Eichkurve mit Tri-C17-glycerin (Sigma) mittels des Pro-
gramms ChromStar (SKS, Beichenheim).

Für die quantitative Bestimmung der Ölgehalte werden Samen von jeweils 10 Pflanzen derselben unabhängigen transgenen Linie ana-
30 lysiert. Insgesamt wurde der Ölgehalt von 30 transgene Linien der T1 Generation, 10 transgene Linien mit je 10 Pflanzen der T2 Ge-
neration und 5 transgene Linien mit je 10 Pflanzen der T3 Linien bestimmt. Dabei zeigen die transgenen Pflanzen einen signifikant höheren Ölgehalt als entsprechend gleichbehandelte Kontrollpflan-
35 zen.

Beispiel 7:

Zum Nachweis der Funktionalität der multiplen RNAi Konstrukte wurden Gene ausgewählt, deren Supression einen deutlichen phäno-
40 logischen Effekt hervorrufen. Ein solches Gen ist zum Beispiel Toc159. Dieses Gen ist essentiell für die Entwicklung und Funk-
tionalität von Chloroplasten in Arabidopsis (Bauer et al. Nature, 403, 203-207). Ein Ausschalten dieses Gens führt zu chlorophyll-
45 defizienten Pflanzen, deren Blatt-Erscheinungsbild dann hell-grün bis weiss ist. Dieser Albino-Phänotyp ist sehr leicht zu unter-
scheiden von normalen Pflanzen.

Als weiteres visuelles Reprotergen wurde GFP, das grün-fluoreszierende Protein aus der Qualle Aequorea victoria eingesetzt.

Dieses Reportergen ist ein häufig verwendetes Reportergen in Pflanzen (siehe z.B. Stewart, Plant Cell Rep 2001 20(5):376-82).

5 Ausgehend von Arabidopsis thaliana cDNA oder vom Plasmid pEGFP (BD Clontech, Heidelberg, Genbank-Eintrag U476561) wurde über PCR mittels der aufgeführten Oligonukleotide erzeugt. Dabei wurde folgendes Protokoll eingesetzt:

10 Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

5,00 µL Template cDNA oder genomische DNA (ca. 1 µg)
 5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25 mM MgCl₂
 5,00 µL 2mM dNTP

15 1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)
 0,50 µL Advantage-Polymerase (Clontech)

PCR-Programm: Anfangsdenaturierung für 2 min bei 95°C, dann 35 Zyklen mit 45 sec 95°C, 45 sec 55°C und 2 min 72°C. Abschliessende

20 Extension von 5 min bei 72°C.

a) Ausgangsvektor pGEM-Toc159: Ausgehend von Arabidopsis cDNA wurde mit nachfolgendem Oligonukleotid-Primerpaar ein Fragment aus Toc159 (Genbank Acc.-No. **T14P8.24**) amplifiziert:

25
 ONP18 (SEQ ID NO: 123):
 5'-CTCGAGGAATTCATGGACTCAAAGTCGGTTACTCCA

ONP19 (SEQ ID NO: 124):

30 5'-GGATCCATAAGCAAGCTTTCTACTCTCCCCATCTGTGGA

Das PCR Produkt wurde in den Vektor pGEM-T easy von Promega (Mannheim) gemäss Herstellerangaben kloniert, resultierend in dem pGEM-Toc159 Vektor und die Sequenz überprüft.

35
 b) Ausgangsvektor pGEM-GFP: Ausgehend von dem Plasmid pEGFP (BD Clontech, Heidelberg, GenbankAcc.-No.: U476561) wurde mit nachfolgendem Oligonukleotid-Primerpaar ein Fragment aus GFP amplifiziert:

40
 ONP20 (SEQ ID NO: 125): 5'-AAGCTTCCAACACTTGTCACTACTTT
 ONP21 (SEQ ID NO: 126): 5'-GGATCCTTAAAGCTCATCATGTTTGT

Das PCR Produkt wurde in den Vektor pGEM-T easy von Promega

45 (Mannheim) gemäss Herstellerangaben kloniert, resultierend in dem pGEM-GFP Vektor und die Sequenz überprüft.

c) Herstellung des Konstruktes pGEM-159-GFP Der Vektor pGEM-GFP wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI für 2 Stunden inkubiert. Parallel wurde der Vektor pGEM-Toc159 mit den gleichen Restriktionsenzymen inkubiert, anschliessend dann zusätzlich für 5 15 min mit alkalischer Phosphatase behandelt. Die alkalische Phosphatase wurde anschliessend durch Erhitzen auf 95 oC für 10 min inaktiviert. Die entstandenen DNA-Fragmente aus beiden Ansätzen wurden über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das 558 bp Fragment aus pGEM-GFP sowie das 3471 bp Fragment von pGEM-Toc159 10 wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem „Gelpurification“-Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Beide Fragmente wurden für 2 h bei 16°C ligiert (T4 Ligase, New England Biolabs) und anschliessend nach Herstellerangaben in E. coli DH5 α Zellen (Stratagene) transformiert. Positive Klone wurden durch PCR 15 mit dem Primerpaar OPN1 und OPN4 identifiziert und anschliessend verifiziert durch Sequenzierung. Der erhaltene Vektor wurde mit pGEM-159-GFP bezeichnet.

d) Herstellung des Suppressionskonstruktes 1: Der Vektor 20 pGEM-159-GFP wurde einerseits mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI, ein weiterer Ansatz mit BamHI und SalI inkubiert. Der zweite Ansatz mit BamHI/SalI wurde anschliessend für weitere 15 min mit alkalischer Phosphatase inkubiert. Die DNA-Fragmente aus beiden Ansätzen wurden über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt 25 und folgende Fragmente ausgeschnitten: Ansatz BamHI-XhoI das 1091 bp Fragment; Ansatz BamHI-SalI das 4029 bp Fragment. Beide Fragmente wurden nach Aufreinigung aus dem Agarose-Gel (siehe oben) für 2 h bei 16°C mit T4 Ligase inkubiert und anschliessend in E. coli DH5 α Zellen (Stratagene) transformiert. Positive Klone wurden 30 durch PCR mit dem Primerpaar OPN1 identifiziert und anschliessend verifiziert durch Sequenzierung. Der erhaltene Vektor wurde als Suppressionskonstrukt 1 bezeichnet.

e) Herstellung des Suppressionskonstruktes 2: Das Suppressionskonstrukt 1 und der Vektor p3300.1 (Andreas Hilbrunner, Dissertation 35 ETH Zürich, 2003) wurden für 2h Stunden mit dem Restriktionsenzym EcoRI inkubiert. Anschliessend wurde der Vektor p3300.1 15 min mit alkalischer Phosphatase behandelt. Beide Ansätze wurden gemischt und für 2 h bei 16°C mit T4 Ligase inkubiert. Der Ligationsansatz wurde dann in E. coli DH5 α Zellen (Stratagene) transformiert. Das entstandene Suppressionskonstrukt 2 wurde dann für die Agrobacterium- und Pflanzentransformation eingesetzt. Die Nukleinsäuresequenz kodierend für Suppressionskonstrukt 2 (p3300.1-Toc159-GFP-RNAi) ist unter SEQ ID NO: 122 wiedergegeben.

Die Transformation von Agrobakterien und Pflanzen wurde wie in Beispiel 3 bzw. 4 beschrieben durchgeführt. Zum Nachweis der Funktionalität des Suppressionskonstruktes 2 wurde dieses durch die nach Bechtold et al., 1993 (C.R. Acad. Sci. Ser. III Sci.

5 Vie., 316, 1194-1199) beschriebene Blüten-Transformationsmethode in Arabidopsis transformiert. Aus Ausgangsmaterial wurden Arabidopsis Pflanzen der Varietät Columbia-0 verwendet, die bereits die T-DNA des binären Vektors pBIN-35S-GFP enthielten.

10 Durch Anregung durch ultraviolette Licht im Wellenlängenbereich 470-490 nm die grüne Fluoreszenz von GFP in diesen Pflanzen angeregt werden und damit die Expression des eingebrachten Transgens überprüft werden. Dazu wurden Keimlinge 1 Woche nach Keimung oder Blattstücke bei älteren Pflanzen mit dem Fluoreszenzmikroskop

15 MZFLIII von Leica analysiert. Zur Anregung von GFP wurden folgende Parameter eingestellt: Quecksilberlampe HBO 100W/DC, Filter GFP3, Bildbearbeitung Leica-Software. Speziell die Verwendung eines Filters (GFP3), der oberhalb einer Wellenlänge von 525 nm nicht mehr durchlässig ist, ermöglicht die GFP-Analyse von grünen

20 Blattmaterial. Ohne diesen Filter könnte die starke Autofluoreszenz des Blattfarbstoffes Chlorophyll nicht ausgeschlossen werden. Die zur Transformation verwendete Arabidopsis Linie zeigte eine starke GFP Expression nach mikroskopischer Analyse.

25 Transformierte Samen wurden direkt auf Erde ausgelegt und angezogen. Nach einer Woche wurde nach Keimlingen gesucht, die keinen oder einen reduzierten Anteil des Blattfarbstoffes Chlorophyll enthielten. Solche Pflanzen waren leicht an ihrer hellgrünen oder weisen Erscheinungsbild zu erkennen. Diese Pflanzen wurden dann

30 weiter durch Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht und mit entsprechend parallel gewachsenen grünen Pflanzen verglichen. Fig.5A zeigt beispielhaft ein solche identifizierte Pflanze, die sich deutlich in der Farbe der Blätter von parallel gewachsenen Pflanzen unterscheidet. Dabei ist der Albino-Phänotyp (weisse Blätter)

35 auf die Wirkung des Toc159-Suppressionskonstrukts zurückzuführen. Die nicht transformierten Nachkommen der mit Agrobacterium-Suspension behandelten Pflanzen zeigen den Albino-Phänotyp nicht. Der auftretende Albino-Phänotyp ist damit ein spezifischer Effekt des eingebrachten Suppressionskonstruktes.

40 Die Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchung der Albino-Pflanzen zeigte dann (Fig.5B), dass keine GFP-Signale in solchen Pflanzen gefunden werden konnte. Im Vergleich dazu zeigten die parallel gewachsenen grünen Pflanzen deutliche GFP Signale. Die Abwesenheit des GFP-Signals in allen identifizierten Albino-Pflanzen demonstriert die Funktionalität des Suppressionskonstruktes, denn nur die mit dem Suppressionkonstrukt transformierten Pflanzen

80

zeigten keine GFP-Signale mehr. Es konnte keine Segregation der beiden angestrebten Phänotypen beobachtet werden. Damit konnte gezeigt werden, dass durch Verwendung von nur einem Kontrollelement (Promotor) zwei funktionell völlig unterschiedliche Gene,
5 die ihrerseits durch unterschiedliche Kontrollelemente in ihrer Expression reguliert werden, ausgeschaltet werden konnten.

10

15

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Verfahren zur Verminderung der Expression von mindestens zwei verschiedenen, endogenen Zielgenen in einer eukaryotischen Zelle oder einem eukaryotischen Organismus durch Einbringen eines zumindest teilweise doppelsträngigen Ribonukleinsäuremoleküls in besagte eukaryotische Zelle oder besagten eukaryotischen Organismus, wobei das doppelsträngige Ribonuklein-säuremolekül umfasst
 - a) mindestens zwei "sense"-Ribonukleotidsequenzen, wobei jeweils mindestens eine dieser "sense"-Ribonukleotidsequenzen im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines jeden der besagten endogenen Zielgene und
 - b) "antisense"-Ribonukleotidsequenzen, die zu besagten "sense"-Ribonukleotidsequenzen unter a) im wesentlichen komplementären sind.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die transkribierten RNAs von mindestens zwei der in ihrer Expression verminderten Zielgene untereinander eine Homologie von unter 90% haben.
- 25 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die doppelsträngige RNA durch ein einziges selbstkomplementäres Ribonukleotidmolekül gebildet wird.
- 30 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei mindestens eine der ausgehend von den einzelnen "sense"-Ribonukleotidsequenzen gebildeten doppelsträngigen RNA-Strukturen eine Länge eines geradzahligen Vielfachen von 21 oder 22 Basenpaaren hat.
- 35 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Ribonukleotidmolekül zwischen mindestens einer "sense"-Ribonukleotidsequenz und der dazu im wesentlichen komplementären "anti-sense"-Ribonukleotidsequenz eine Ribonukleotidsequenz kodierend für ein Intron enthält.

82

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei der endogenen Zielgene ausgewählt sind aus jeweils unterschiedlichen Klassen von Speicherprotein ausgewählt aus den Speicherprotein-Klassen der 5 2S-Albumine, 7S-Globuline, 11S/12S-Globuline oder Zein-Prolamine.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei mindestens eine "sense"-Ribonukleotidsequenz im wesentlichen identisch 10 ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes

a) einer Speicherprotein-Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 59, 61, 15 63, 65, 67, 69, 71, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109 oder 112, oder

b) eines Gens aus dem Homogentisatabbauweg gemäß SEQ ID NO: 20 115, 116, 118 oder 120, oder

c) eines Gens ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Acetyltransacylasen, Acyltransportproteinen, Fettsäuredesaturasen, Malonyltransacylasen, β -Ketoacyl-ACP-synthetasen, 3-Keto-ACP-reduktasen, Enoyl-ACP-hydrasen, Thioesterasen, Enoyl-ACP-reduktasen, ADP-Glucosepyrophosphorylasen, Phosphorylasen, Stärkesynthetasen, Q-Enzymen, Sucrose-6-phosphatsynthetasen, Sucrose-6-phosphatphosphatasen, ADP-Glucosepyrophosphorylasen, Branching-Enzymen, Debranching-Enzymen, Amylasen, Chalconsynthetasen, Chalconisomerasen, Phenylalaninammonialyasen, Dehydrokaempferol(flavone)hydroxylasen, Dihydroflavonolreduktasen, Di-hydroflavanol-2-hydroxylasen, Flavonoid-3'-hydroxylasen, Flavonoid-5'-hydroxylasen, Flavonoidglycosyltransferasen, Flavonoidmethyltransferasen, Flavonoiddacyltransferasen, 25 Polygalacturonasen, Cellulasen, Pectinesterasen, β -(1-4)Glucanasen, β -Galactanasen, 1-Aminocyclopropan-1-carboxylatsynthetasen, Phytoendesaturasen, Cinnamoyl-CoA:NADPH-Reduktasen, Cinnamoylalkoholdehydrogenasen, Coffeinsäure-O-methyltransferasen Cinnamoylalkoholdehyrogenasen, Polyphenoloxidases, Homogentisat-1,2-dioxygenasen, Maleylacetoacetatisomerasen, Fumarylacetoacetathydrolasen, N-Methyl-putrescinoxidasen, Putrescin-N-methyltransferasen, 35 7-Methylxanthine-3-methyltransferasen, 1-Methylxanthin-3-methyltransferasen und Threoninsynthasen.

30

35

40

45

8. Ribonukleinsäuremolekül, das eine zumindest teilweise doppelsträngige Struktur hat und umfasst

5 a) mindestens zwei "sense"-Ribonukleotidsequenzen, wobei jeweils mindestens eine dieser "sense"-Ribonukleotidsequenzen im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines endogenen Zielgens, wobei jedoch nicht alle "sense"-Ribonukleotidsequenzen zu dem "sense"-RNA-Transkript eines einzigen endogenen Zielgens im wesentlichen identisch sind, und

10 b) "antisense"-Ribonukleotidsequenzen, die zu besagten "sense"-Ribonukleotidsequenzen unter a) im wesentlichen komplementären sind.

15 9. Ribonukleinsäuremolekül nach Anspruch 8, wobei das Ribonukleinsäuremolekül wie in einem der Ansprüche 2 bis 7 gekennzeichnet ist.

20 10. Transgene Expressionskassette enthaltend in funktioneller Verknüpfung mit einem Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodierend für doppelsträngiges Ribonukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 8 oder 9, wobei das Ribonukleinsäuremolekül aus einem einzigen RNA-Strang gebildet wird.

25 11. Transgenes Expressionssystem enthaltend

30 a) in funktioneller Verknüpfung mit einem Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodierend für "sense"-Ribonukleotidsequenzen eines doppelsträngigen Ribonukleinsäuremoleküls gemäß einem der Ansprüche 8 oder 9 und

35 b) in funktioneller Verknüpfung mit einem Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodierend für "antisense"-Ribonukleotidsequenzen eines doppelsträngigen Ribonukleinsäuremoleküls gemäß einem der Ansprüche 8 oder 9,

40 wobei das Ribonukleinsäuremolekül aus den beiden unter a) und b) definierten Strängen gebildet wird, und die Promotoren so gewählt sind, dass in einem bestimmten Organismus oder Zelle die gleichzeitige Expression von "sense"-Ribonukleotidsequenzen und "antisense"-Ribonukleotidsequenzen gewährleistet ist.

12. Transgener Vektor enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß Anspruch 10 oder ein transgenes Expressionssystem gemäß Anspruch 11.
- 5 13. Transgener Organismus enthaltend eine transgene Expressionskassette gemäß Anspruch 10 oder ein transgenes Expressionssystem gemäß Anspruch 11 oder einen transgenen Vektor gemäß Anspruch 12.
- 10 14. Transgener Organismus nach Anspruch 13 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, nicht-menschlichen Tieren und Pflanzen.
15. Transgener Organismus nach Ansprüche 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe der landwirtschaftlichen Nutzpflanzen.
- 20 16. Verwendung eines Ribonukleotidmoleküls nach einem der Ansprüche 8 oder 9, einer transgenen Expressionskassette gemäß Anspruch 10, eines transgenen Expressionssystems gemäß Anspruch 11, eines transgenen Vektors gemäß Anspruch 12 oder eines transgenen Organismus gemäß einem der Ansprüche 13 bis 15 zur Herstellung von Arzneimitteln, in biotechnologischen Verfahren oder in der Pflanzenbiotechnologie.
- 25 17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei mindestens einer der nachfolgenden Eigenschaften in Pflanzen erzielt wird:
 - a) Verbesserter Schutz gegen abiotische Stressfaktoren
 - 30 b) Modifikation der Zusammensetzung und/oder des Gehaltes an Fettsäuren, Lipiden oder Ölen
 - c) Modifikation der Kohlenhydratzusammensetzung
 - 35 d) Veränderung der Farbe oder Pigmentierung
 - e) Verminderung des Gehaltes von Speicherproteinen
 - 40 f) Erreichen einer Resistenz gegen pflanzliche Pathogene
 - g) Verhinderung von Halmbruch
 - h) Verzögerung der Fruchtreifung
 - 45 i) Erzielen einer männlichen Sterilität

85

- j) Verminderung unerwünschter oder toxischer Pflanzeninhaltsstoffe
- 5 k) Verzögerung von Alterserscheinungen
- l) Modifikation der Lignifikation und/oder des Ligningehaltes
- 10 m) Modifikation des Faseranteils in Nahrungsmitteln oder der Faserqualität in Baumwolle
- n) Verminderung der Stoßanfälligkeit
- 15 o) Steigerung der Vitamin E Biosynthese
- p) Verminderung des Nikotingehaltes, des Coffeingehaltes oder des Theophyllin-Gehaltes
- 20 q) Erhöhung des Methioningehaltes durch Verminderung der Threoninbiosynthese

25

30

35

40

45

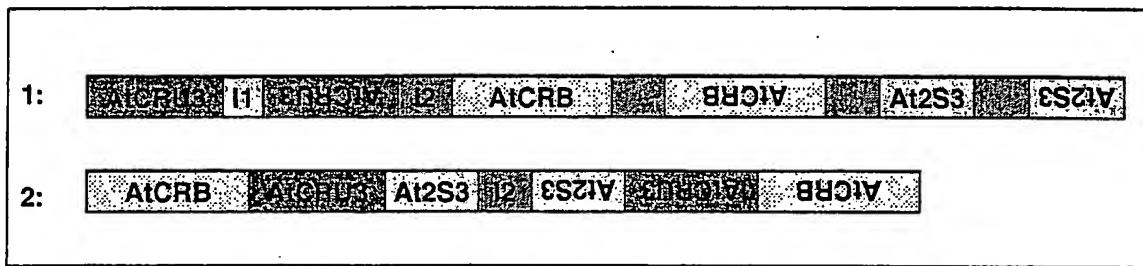


Fig. 1

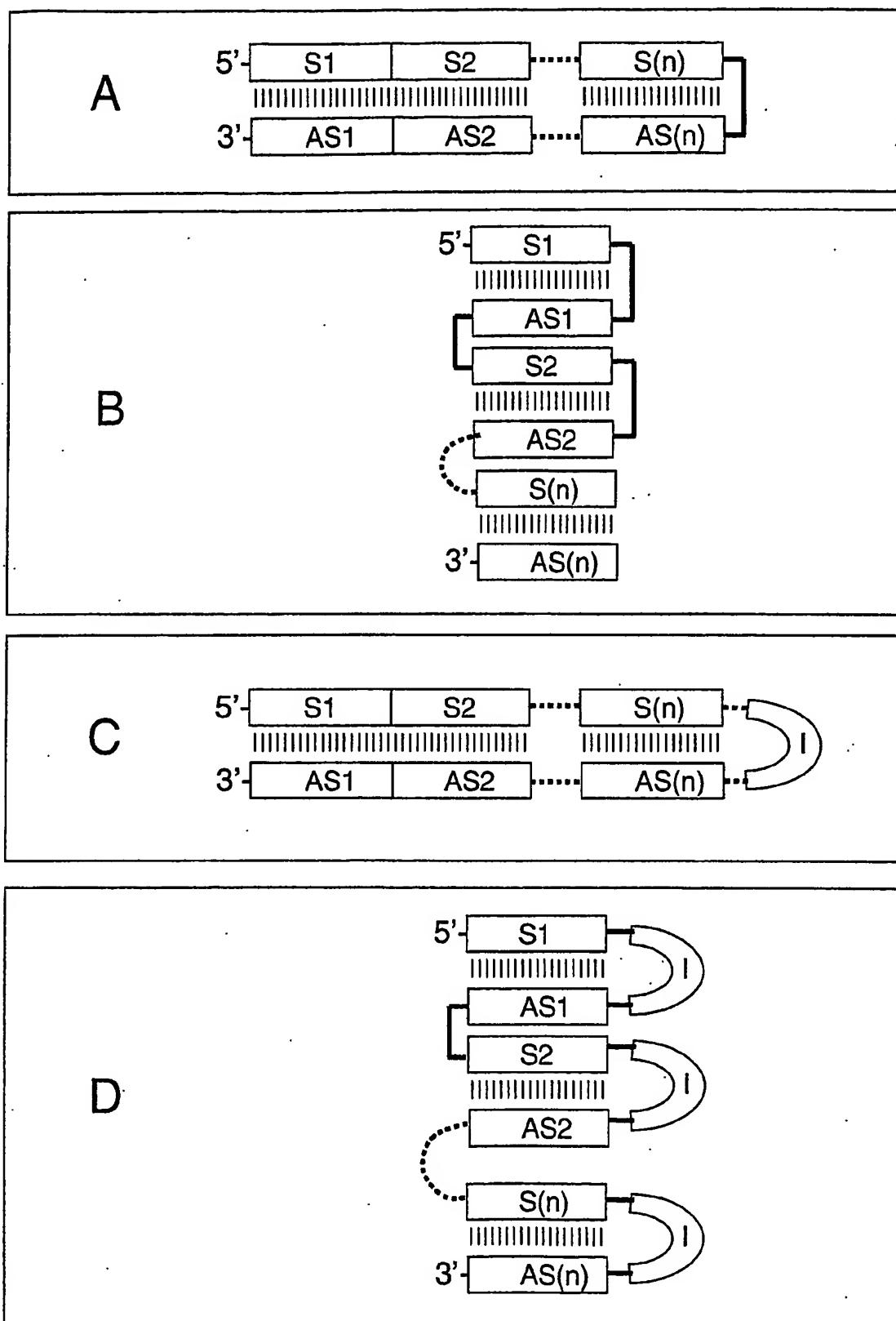


Fig.2

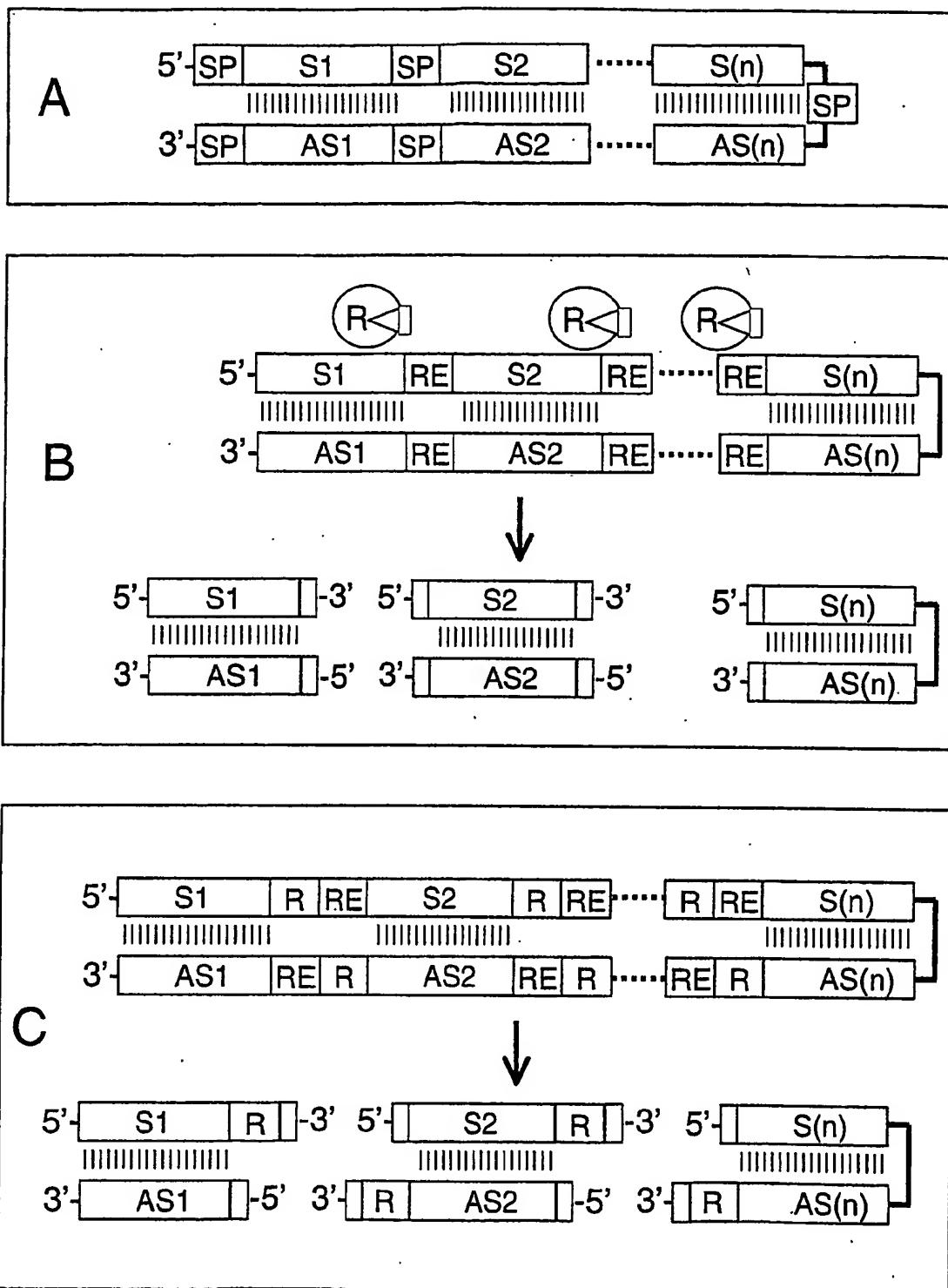


Fig.3

4 / 5

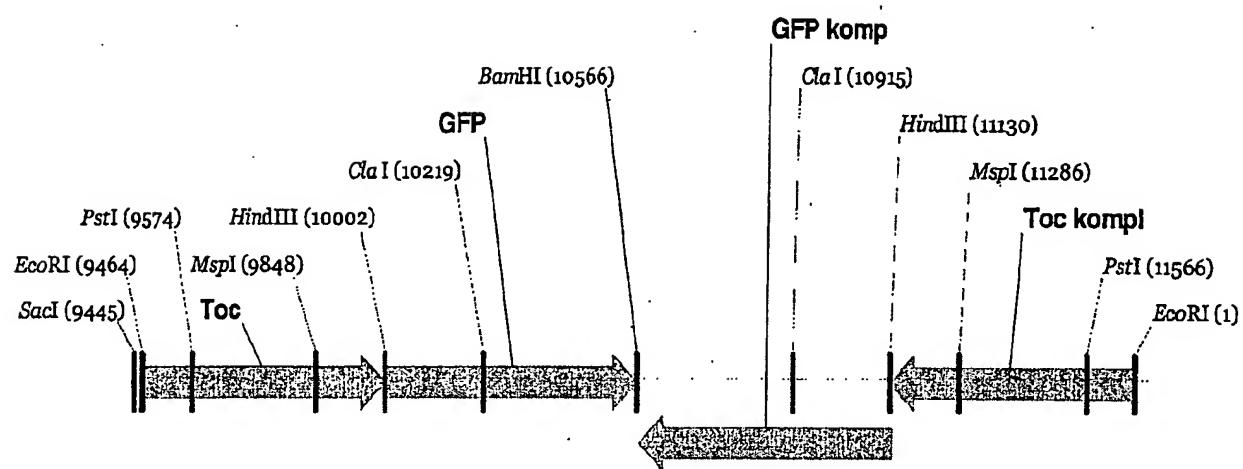
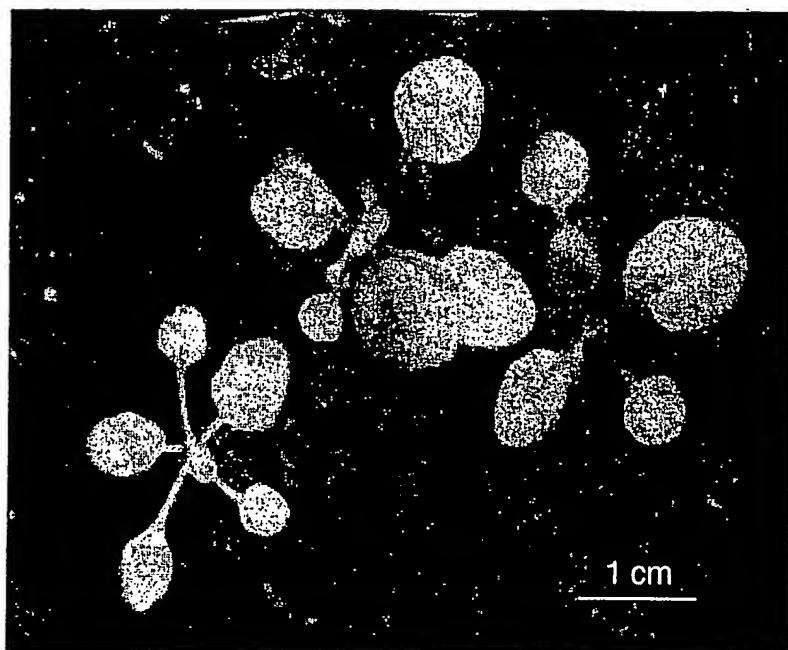
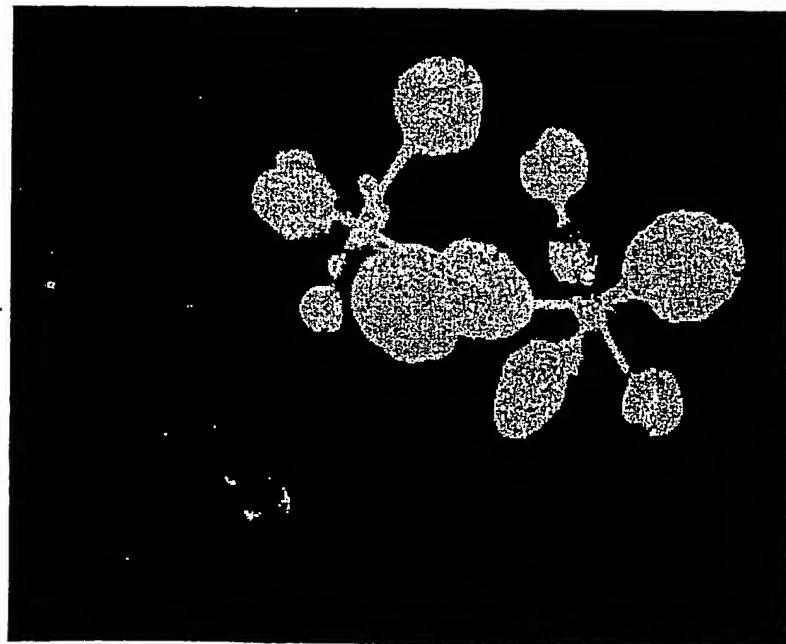


Fig.4

A**B****Fig.5**

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Plant Science GmbH
 <120> Konstrukte und Verfahren zur Regulation der Genexpression
 <130> PD009300062-AT
 <140>
 <141>
 <160> 126
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 495
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(492)
 <223> albumine 2S subunit 1
 <400> 1
 atg gca aac aag ttg ttc ctc gtc tgc gca gct ctc gct ctc tgc ttc . 48
 Met Ala Asn Lys Leu Phe Leu Val Cys Ala Ala Leu Ala Leu Cys Phe
 1 5 10 15
 ctc ctc acc aac gct tcc atc tac cgc acc gtc gtt gag ttc gaa gaa . 96
 Leu Leu Thr Asn Ala Ser Ile Tyr Arg Thr Val Val Glu Phe Glu Glu
 20 25 30
 gat gac gcc act aac ccc ata ggc cca aaa atg agg aaa tgc cgc aag . 144
 Asp Asp Ala Thr Asn Pro Ile Gly Pro Lys Met Arg Lys Cys Arg Lys
 35 40 45
 gag ttt cag aaa gaa caa cac cta aga gct tgc cag caa ttg atg ctc . 192
 Glu Phe Gln Lys Glu Gln His Leu Arg Ala Cys Gln Gln Leu Met Leu
 50 55 60
 cag caa gca agg caa ggc cgt agc gat gag ttt gat ttc gaa gac gac . 240
 Gln Gln Ala Arg Gln Gly Arg Ser Asp Glu Phe Asp Phe Glu Asp Asp
 65 70 75 80
 atg gag aac cca cag gga caa cag cag gaa caa cag cta ttc cag cag . 288
 Met Glu Asn Pro Gln Gly Gln Gln Glu Gln Gln Leu Phe Gln Gln
 85 90 95
 tgc tgc aac gag ctt cgc cag gaa gag cca gat tgt gtt tgc ccc acc . 336
 Cys Cys Asn Glu Leu Arg Gln Glu Glu Pro Asp Cys Val Cys Pro Thr
 100 105 110
 ttg aaa caa gct gcc aag gcc gtt aga ctc cag gga cag cac caa cca . 384
 Leu Lys Gln Ala Ala Lys Ala Val Arg Leu Gln Gly Gln His Gln Pro
 115 120 125
 atg caa gtc agg aaa att tac cag aca gcc aag cac ttg ccc aac gtt . 432
 Met Gln Val Arg Lys Ile Tyr Gln Thr Ala Lys His Leu Pro Asn Val
 130 135 140
 tgc gac atc ccg caa gtt gat gtt tgt ccc ttc aac atc cct tca ttc . 480
 Cys Asp Ile Pro Gln Val Asp Val Cys Pro Phe Asn Ile Pro Ser Phe
 145 150 155 160
 cct tct ttc tac taa . 495
 Pro Ser Phe Tyr

<210> 2
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 2
 Met Ala Asn Lys Leu Phe Leu Val Cys Ala Ala Leu Ala Leu Cys Phe
 1 5 10 15
 Leu Leu Thr Asn Ala Ser Ile Tyr Arg Thr Val Val Glu Phe Glu Glu
 20 25 30
 Asp Asp Ala Thr Asn Pro Ile Gly Pro Lys Met Arg Lys Cys Arg Lys
 35 40 45
 Glu Phe Gln Lys Glu Gln His Leu Arg Ala Cys Gln Gln Leu Met Leu
 50 55 60
 Gln Gln Ala Arg Gln Gly Arg Ser Asp Glu Phe Asp Phe Glu Asp Asp
 65 70 75 80
 Met Glu Asn Pro Gln Gly Gln Gln Glu Gln Gln Leu Phe Gln Gln
 85 90 95
 Cys Cys Asn Glu Leu Arg Gln Glu Glu Pro Asp Cys Val Cys Pro Thr
 100 105 110
 Leu Lys Gln Ala Ala Lys Ala Val Arg Leu Gln Gly Gln His Gln Pro
 115 120 125
 Met Gln Val Arg Lys Ile Tyr Gln Thr Ala Lys His Leu Pro Asn Val
 130 135 140
 Cys Asp Ile Pro Gln Val Asp Val Cys Pro Phe Asn Ile Pro Ser Phe
 145 150 155 160
 Pro Ser Phe Tyr

<210> 3
 <211> 495
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(492)
 <223> albumine 2S subunit 3
 <400> 3
 atg gct aac aag ctc ttc ctc gtc tgc gca act ctc gcc ctc tgc ttc 48
 Met Ala Asn Lys Leu Phe Leu Val Cys Ala Thr Leu Ala Leu Cys Phe
 1 5 10 15
 ctc ctc acc aac gct tcc atc tac cgc acc gtt gtc gaa ttc gaa gaa 96
 Leu Leu Thr Asn Ala Ser Ile Tyr Arg Thr Val Val Glu Phe Glu Glu
 20 25 30
 gat gac gcc agc aac ccc gta ggt cca aga cag aga tgc cag aag gag 144
 Asp Asp Ala Ser Asn Pro Val Gly Pro Arg Gln Arg Cys Gln Lys Glu
 35 40 45
 ttt cag caa tca caa cac cta aga gct tgc cag aga tgg atg agc aag 192
 Phe Gln Gln Ser Gln His Leu Arg Ala Cys Gln Arg Trp Met Ser Lys
 50 55 60

caa atg agg caa gga cgt ggt ggt cct tcc ctc gac gat gag ttc Gln Met Arg Gln Gly Arg Gly Gly Pro Ser Leu Asp Asp Glu Phe 65 70 75 80	240
gat ttg gag ggc ccc cag cag gga tac cag cta ctc cag cag tgc tgc Asp Phe Glu Gly Pro Gln Gln Gly Tyr Gln Leu Leu Gln Gln Cys Cys 85 90 95	288
aac gag ctt cgc cag gaa gag cca gtt tgc gtt tgc ccc acc ttg aaa Asn Glu Leu Arg Gln Glu Glu Pro Val Cys Val Cys Pro Thr Leu Lys 100 105 110	336
caa gct gcc agg gca gtt agc ctc cag gga cag cac gga cca ttc caa Gln Ala Ala Arg Ala Val Ser Leu Gln Gly Gln His Gly Pro Phe Gln 115 120 125	384
tcc agg aaa att tac cag tca gct aag tac ttg cct aac att tgc aag Ser Arg Lys Ile Tyr Gln Ser Ala Lys Tyr Leu Pro Asn Ile Cys Lys 130 135 140	432
atc cag caa gtt ggt gaa tgt ccc ttc cag acc acc atc cct ttc ttc Ile Gln Gln Val Gly Glu Cys Pro Phe Gln Thr Thr Ile Pro Phe Phe 145 150 155 160	480
cct cct tac tac tag Pro Pro Tyr Tyr	495
<210> 4	
<211> 164	
<212> PRT	
<213> Arabidopsis thaliana	
<400> 4	
Met Ala Asn Lys Leu Phe Leu Val Cys Ala Thr Leu Ala Leu Cys Phe 1 5 10 15	
Leu Leu Thr Asn Ala Ser Ile Tyr Arg Thr Val Val Glu Phe Glu Glu 20 25 30	
Asp Asp Ala Ser Asn Pro Val Gly Pro Arg Gln Arg Cys Gln Lys Glu 35 40 45	
Phe Gln Gln Ser Gln His Leu Arg Ala Cys Gln Arg Trp Met Ser Lys 50 55 60	
Gln Met Arg Gln Gly Arg Gly Gly Pro Ser Leu Asp Asp Glu Phe 65 70 75 80	
Asp Phe Glu Gly Pro Gln Gln Gly Tyr Gln Leu Leu Gln Gln Cys Cys 85 90 95	
Asn Glu Leu Arg Gln Glu Glu Pro Val Cys Val Cys Pro Thr Leu Lys 100 105 110	
Gln Ala Ala Arg Ala Val Ser Leu Gln Gly Gln His Gly Pro Phe Gln 115 120 125	
Ser Arg Lys Ile Tyr Gln Ser Ala Lys Tyr Leu Pro Asn Ile Cys Lys 130 135 140	
Ile Gln Gln Val Gly Glu Cys Pro Phe Gln Thr Thr Ile Pro Phe Phe 145 150 155 160	
Pro Pro Tyr Tyr	

<210> 5

<211> 513

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(510)

<223> albumine 2S subunit 2

<400> 5

atg gca aac aag ctc ttc ctc gtc tgc gca a ^c t ttc gcc ctc tgc ttc	48
Met Ala Asn Lys Leu Phe Leu Val Cys Ala Thr Phe Ala Leu Cys Phe	
1 5 10 15	

ctc ctc acc aac gct tcc atc tac cgc act gtt gtc gag ttc gac gaa	96
Leu Leu Thr Asn Ala Ser Ile Tyr Arg Thr Val Val Glu Phe Asp Glu	
20 25 30	

gat gac gcc agc aac ccc atg ggc cca aga cag aaa tgt cag aag gag	144
Asp Asp Ala Ser Asn Pro Met Gly Pro Arg Gln Lys Cys Gln Lys Glu	
35 40 45	

ttt cag caa tca cag cac cta aga gct tgc cag aaa ttg atg cgc atg	192
Phe Gln Gln Ser Gln His Leu Arg Ala Cys Gln Lys Leu Met Arg Met	
50 55 60	

caa atg agg caa ggc cgt ggt ggt ccc tcc ctc gac gat gag ttc	240
Gln Met Arg Gln Gly Arg Gly Gly Pro Ser Leu Asp Asp Glu Phe	
65 70 75 80	

gat ttg gaa gac gac atc gag aac cca caa ggc ccc cag cag gga cac	288
Asp Leu Glu Asp Asp Ile Glu Asn Pro Gln Gly Pro Gln Gln Gly His	
85 90 95	

cag atc ctc cag cag tgc tgc agc gag ctt cgc cag gaa gag cca gtt	336
Gln Ile Leu Gln Gln Cys Ser Glu Leu Arg Gln Glu Glu Pro Val	
100 105 110	

tgt gtt tgc ccc acc ttg aga caa gct gcc agg gcc gtt agc ctc cag	384
Cys Val Cys Pro Thr Leu Arg Gln Ala Ala Arg Ala Val Ser Leu Gln	
115 120 125	

gga caa cac gga cca ttc caa tcc agg aaa att tac aag aca gct aag	432
Gly Gln His Gly Pro Phe Gln Ser Arg Lys Ile Tyr Lys Thr Ala Lys	
130 135 140	

tac ttg cct aac att tgc aag atc cag caa gtt ggt gaa tgc ccc ttc	480
Tyr Leu Pro Asn Ile Cys Lys Ile Gln Gln Val Gly Glu Cys Pro Phe	
145 150 155 160	

cag acc acc atc cct ttc ctc cct tac taa	513
Gln Thr Thr Ile Pro Phe Phe Pro Pro Tyr	
165 170	

<210> 6

<211> 170

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

Met Ala Asn Lys Leu Phe Leu Val Cys Ala Thr Phe Ala Leu Cys Phe	
1 5 10 15	

Leu Leu Thr Asn Ala Ser Ile Tyr Arg Thr Val Val Glu Phe Asp Glu	
20 25 30	

Asp Asp Ala Ser Asn Pro Met Gly Pro Arg Gln Lys Cys Gln Lys Glu	
35 40 45	

Phe Gln Gln Ser Gln His Leu Arg Ala Cys Gln Lys Leu Met Arg Met
 50 55 60

Gln Met Arg Gln Gly Arg Gly Gly Pro Ser Leu Asp Asp Glu Phe
 65 70 75 80

Asp Leu Glu Asp Asp Ile Glu Asn Pro Gln Gly Pro Gln Gln Gly His
 85 90 95

Gln Ile Leu Gln Gln Cys Cys Ser Glu Leu Arg Gln Glu Glu Pro Val
 100 105 110

Cys Val Cys Pro Thr Leu Arg Gln Ala Ala Arg Ala Val Ser Leu Gln
 115 120 125

Gly Gln His Gly Pro Phe Gln Ser Arg Lys Ile Tyr Lys Thr Ala Lys
 130 135 140

Tyr Leu Pro Asn Ile Cys Lys Ile Gln Gln Val Gly Glu Cys Pro Phe
 145 150 155 160

Gln Thr Thr Ile Pro Phe Phe Pro Pro Tyr
 165 170

<210> 7
<211> 501
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(498)
<223> albumine 2S subunit 4

<400> 7

atg	gcg	aac	aag	ctc	tcc	ctc	gtc	tgc	gca	gct	ctc	gcc	ctg	tgt	ttc		48
Met																	
1				5						10					15		

atc	ctc	acc	aac	gct	tcc	tat	cgc	acc	gtt	gtc	gag	ttc	gac	gaa		96	
Ile																	
						20			25					30			

gat	gac	gcc	agt	aac	ccc	ata	ggc	cca	ata	cag	aaa	tgt	cag	aag	gag		144
Asp																	
						35			40				45				

ttt	cag	caa	gac	cag	cac	cta	aga	gct	tgc	cag	aga	tgg	atg	cgc	aag		192
Phe																	
						50			55			60					

caa	atg	tgg	caa	gga	cgt	ggt	ggt	cct	tcc	ctc	gac	gat	gag	ttc		240
Gln																
						65			70			75		80		

gat	atg	gaa	gac	gac	atc	gag	aac	ccg	cag	aga	cga	cag	cta	ctc	cag		288
Asp																	
						85			90			95					

aag	tgc	tgc	agc	gag	ctt	cgc	caa	gaa	gag	cca	gtt	tgc	gtt	tgc	ccc		336
Lys																	
						100			105			110					

acc	ttg	aga	caa	gct	gcc	aag	gcc	gtt	aga	tgc	cag	gga	cag	caa	cac		384
Thr																	
						115			120			125					

caa cca gag caa gtc agg aaa att tac cag gca gct aag tac ttg cct 432
 Gln Pro Glu Gln Val Arg Lys Ile Tyr Gln Ala Ala Lys Tyr Leu Pro
 130 135 140
 aac att tgc aaa atc cag caa gtt ggt gtt tgc ccc ttc cag atc cct 480
 Asn Ile Cys Lys Ile Gln Gln Val Gly Val Cys Pro Phe Gln Ile Pro
 145 150 155 160
 tca atc cct tct tac tac taa 501
 Ser Ile Pro Ser Tyr Tyr
 165

<210> 8
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 8
 Met Ala Asn Lys Leu Phe Leu Val Cys Ala Ala Leu Ala Leu Cys Phe
 1 5 10 15
 Ile Leu Thr Asn Ala Ser Val Tyr Arg Thr Val Val Glu Phe Asp Glu
 20 25 30
 Asp Asp Ala Ser Asn Pro Ile Gly Pro Ile Gln Lys Cys Gln Lys Glu
 35 40 45
 Phe Gln Gln Asp Gln His Leu Arg Ala Cys Gln Arg Trp Met Arg Lys
 50 55 60
 Gln Met Trp Gln Gly Arg Gly Gly Pro Ser Leu Asp Asp Glu Phe
 65 70 75 80
 Asp Met Glu Asp Asp Ile Glu Asn Pro Gln Arg Arg Gln Leu Leu Gln
 85 90 95
 Lys Cys Cys Ser Glu Leu Arg Gln Glu Glu Pro Val Cys Val Cys Pro
 100 105 110
 Thr Leu Arg Gln Ala Ala Lys Ala Val Arg Phe Gln Gly Gln Gln His
 115 120 125
 Gln Pro Glu Gln Val Arg Lys Ile Tyr Gln Ala Ala Lys Tyr Leu Pro
 130 135 140
 Asn Ile Cys Lys Ile Gln Gln Val Gly Val Cys Pro Phe Gln Ile Pro
 145 150 155 160
 Ser Ile Pro Ser Tyr Tyr
 165

<210> 9
 <211> 1473
 <212> DNA
 <213> Brassica napus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1470)
 <223> cruciferin

<400> 9
 atg gct cgg ctc tca tct ctt ctc tct ttt tcc tta gca ctt ttg atc 48
 Met Ala Arg Leu Ser Ser Leu Leu Ser Phe Ser Leu Ala Leu Leu Ile
 1 5 10 15

ttt ctc cat ggc tct aca gct caa cag ttt cca aac gag tgt cag cta Phe Leu His Gly Ser Thr Ala Gln Gln Phe Pro Asn Glu Cys Gln Leu	20	25.	30	96
gac cag ctc aat gca ctg gag ccg tca cac gta ctt aag gct gag gct Asp Gln Leu Asn Ala Leu Glu Pro Ser His Val Leu Lys Ala Glu Ala	35	40	45	144
ggc cgc atc gag gtg tgg gac cac cac gct cct cag cta cgt tgc tct Gly Arg Ile Glu Val Trp Asp His His Ala Pro Gln Leu Arg Cys Ser	50	55	60	192
ggc gtc tcc ttt gta cgt tac atc atc gag tct aag ggt ctc tac ttg Gly Val Ser Phe Val Arg Tyr Ile Ile Glu Ser Lys Gly Leu Tyr Leu	65	70	75	240
ccc tct ttc ttt agc acc gcg aag ctc tcc ttc gtg gct aaa gga gaa Pro Ser Phe Ser Thr Ala Lys Leu Ser Phe Val Ala Lys Gly Glu	85	90	95	288
ggc ctt atg ggg aga gtg gtc cct gga tgc gcc gag aca ttc cag gac Gly Leu Met Gly Arg Val Val Pro Gly Cys Ala Glu Thr Phe Gln Asp	100	105	110	336
tca tca gtg ttt caa cca agc ggt ggt agc ccc tcg gga gaa ggt cag Ser Ser Val Phe Gln Pro Ser Gly Gly Ser Pro Ser Gly Glu Gly Gln	115	120	125	384
ggc caa gga caa caa ggt cag ggc caa ggc cac caa ggt caa ggc caa Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly His Gln Gly Gln Gly Gln	130	135	140	432
gga caa cag ggc caa caa ggt cag caa gga caa cag agt caa ggc cag Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Gly Gln Ser Gln Gly Gln	145	150	155	480
ggc ttc cgt gat atg cac cag aaa gtg gag cac ata agg act ggg gac Gly Phe Arg Asp Met His Gln Lys Val Glu His Ile Arg Thr Gly Asp	165	170	175	528
acc atc gct aca cat ccc ggt gta gcc caa tgg ttc tac aac gac gga Thr Ile Ala Thr His Pro Gly Val Ala Gln Trp Phe Tyr Asn Asp Gly	180	185	190	576
aac caa cca ctt gtc atc gtt tcc gtc ctc gat tta gcc agc cac cag Asn Gln Pro Leu Val Ile Val Ser Val Leu Asp Leu Ala Ser His Gln	195	200	205	624
aat cag ctc gac cgc aac cca agg cca ttt tac tta gcc gga aac aac Asn Gln Leu Asp Arg Asn Pro Arg Pro Phe Tyr Leu Ala Gly Asn Asn	210	215	220	672
cca caa ggc caa gta tgg ata gaa gga cgc gag caa cag cca caa aag Pro Gln Gly Gln Val Trp Ile Glu Gly Arg Glu Gln Gln Pro Gln Lys	225	230	235	720
aac atc ctt aat ggc ttc aca cca gag gtt ctt gct aaa gct ttc aag Asn Ile Leu Asn Gly Phe Thr Pro Glu Val Leu Ala Lys Ala Phe Lys	245	250	255	768
atc gat gtt agg aca gcg caa caa ctt cag aac cag caa gac aac cgt Ile Asp Val Arg Thr Ala Gln Gln Leu Gln Asn Gln Gln Asp Asn Arg	260	265	270	816
gga aac att atc cga gtc caa ggc cca ttc agt gtc att agg ccg cct Gly Asn Ile Ile Arg Val Gln Gly Pro Phe Ser Val Ile Arg Pro Pro	275	280	285	864

ttg agg agt cag aga ccg cag gag aca gaa gtt aac ggt tta gaa gag Leu Arg Ser Gln Arg Pro Gln Glu Thr Glu Val Asn Gly Leu Glu Glu 290 295 300	912
acc ata tgc agc gcg agg tgc acc gat aac ctc gat gac cca tct aat Thr Ile Cys Ser Ala Arg Cys Thr Asp Asn Leu Asp Asp Pro Ser Asn 305 310 315 320	960
gct gac gta tac aag cca cag ctc ggt tac atc agc act ctg aac agc Ala Asp Val Tyr Lys Pro Gln Leu Gly Tyr Ile Ser Thr Leu Asn Ser 325 330 335	1008
tat gat ctc ccc atc ctt cgc ttc ctt cgt ctc tca gcc ctc cgt gga Tyr Asp Leu Pro Ile Leu Arg Phe Leu Arg Leu Ser Ala Leu Arg Gly 340 345 350	1056
tct atc cgt caa aac gcg atg gtg ctt cca cag tgg aac gca aac gca Ser Ile Arg Gln Asn Ala Met Val Leu Pro Gln Trp Asn Ala Asn Ala 355 360 365	1104
aac gcg gtt ctc tac gtg aca gac ggg gaa gcc cat gtg cag gtg gtt Asn Ala Val Leu Tyr Val Thr Asp Gly Glu Ala His Val Gln Val Val 370 375 380	1152
aac gac aac ggt gac aga gtg ttc gac gga caa gtc tct caa gga cag Asn Asp Asn Gly Asp Arg Val Phe Asp Gly Gln Val Ser Gln Gly Gln 385 390 395 400	1200
cta ctt tcc ata cca caa ggt ttc tcc gtg gtg aaa cgc gca aca agc Leu Leu Ser Ile Pro Gln Gly Phe Ser Val Val Lys Arg Ala Thr Ser 405 410 415	1248
gaa cag ttc cgg tgg atc gag ttc aag aca aac gca aac gca cag atc Glu Gln Phe Arg Trp Ile Glu Phe Lys Thr Asn Ala Asn Ala Gln Ile 420 425 430	1296
aac aca ctt gct gga cga acc tcg gtc ttg aga ggt tta cca tta gag Asn Thr Leu Ala Gly Arg Thr Ser Val Leu Arg Gly Leu Pro Leu Glu 435 440 445	1344
gtc ata tcc aat ggg tac caa atc tca ctc gaa gaa gca aga agg gtt Val Ile Ser Asn Gly Tyr Gln Ile Ser Leu Glu Ala Arg Arg Val 450 455 460	1392
aag ttc aac acg atc gag acc act ttg acg cac agc agt ggc cca gct Lys Phe Asn Thr Ile Glu Thr Thr Leu Thr His Ser Ser Gly Pro Ala 465 470 475 480	1440
agc tac gga ggg cca agg aag gct gat gct taa Ser Tyr Gly Gly Pro Arg Lys Ala Asp Ala 485 490	1473
<210> 10	
<211> 490	
<212> PRT	
<213> Brassica napus	
<400> 10	
Met Ala Arg Leu Ser Ser Leu Leu Ser Phe Ser Leu Ala Leu Leu Ile 1 5 10 15	
Phe Leu His Gly Ser Thr Ala Gln Gln Phe Pro Asn Glu Cys Gln Leu 20 25 30	
Asp Gln Leu Asn Ala Leu Glu Pro Ser His Val Leu Lys Ala Glu Ala 35 40 45	

Gly Arg Ile Glu Val Trp Asp His His Ala Pro Gln Leu Arg Cys Ser
 50 55 60
 Gly Val Ser Phe Val Arg Tyr Ile Ile Glu Ser Lys Gly Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Pro Ser Phe Phe Ser Thr Ala Lys Leu Ser Phe Val Ala Lys Gly Glu
 85 90 95
 Gly Leu Met Gly Arg Val Val Pro Gly Cys Ala Glu Thr Phe Gln Asp
 100 105 110
 Ser Ser Val Phe Gln Pro Ser Gly Gly Ser Pro Ser Gly Glu Gly Gln
 115 120 125
 Gly Gln Gly Gln Gln Gly Gln Gly Gln Gly His Gln Gly Gln Gly Gln
 130 135 140
 Gly Gln Gln Gly Gln Gln Gly Gln Gln Gln Ser Gln Gly Gln
 145 150 155 160
 Gly Phe Arg Asp Met His Gln Lys Val Glu His Ile Arg Thr Gly Asp
 165 170 175
 Thr Ile Ala Thr His Pro Gly Val Ala Gln Trp Phe Tyr Asn Asp Gly
 180 185 190
 Asn Gln Pro Leu Val Ile Val Ser Val Leu Asp Leu Ala Ser His Gln
 195 200 205
 Asn Gln Leu Asp Arg Asn Pro Arg Pro Phe Tyr Leu Ala Gly Asn Asn
 210 215 220
 Pro Gln Gly Gln Val Trp Ile Glu Gly Arg Glu Gln Gln Pro Gln Lys
 225 230 235 240
 Asn Ile Leu Asn Gly Phe Thr Pro Glu Val Leu Ala Lys Ala Phe Lys
 245 250 255
 Ile Asp Val Arg Thr Ala Gln Gln Leu Gln Asn Gln Gln Asp Asn Arg
 260 265 270
 Gly Asn Ile Ile Arg Val Gln Gly Pro Phe Ser Val Ile Arg Pro Pro
 275 280 285
 Leu Arg Ser Gln Arg Pro Gln Glu Thr Glu Val Asn Gly Leu Glu Glu
 290 295 300
 Thr Ile Cys Ser Ala Arg Cys Thr Asp Asn Leu Asp Asp Pro Ser Asn
 305 310 315 320
 Ala Asp Val Tyr Lys Pro Gln Leu Gly Tyr Ile Ser Thr Leu Asn Ser
 325 330 335
 Tyr Asp Leu Pro Ile Leu Arg Phe Leu Arg Leu Ser Ala Leu Arg Gly
 340 345 350
 Ser Ile Arg Gln Asn Ala Met Val Leu Pro Gln Trp Asn Ala Asn Ala
 355 360 365
 Asn Ala Val Leu Tyr Val Thr Asp Gly Glu Ala His Val Gln Val Val
 370 375 380
 Asn Asp Asn Gly Asp Arg Val Phe Asp Gly Gln Val Ser Gln Gly Gln
 385 390 395 400
 Leu Leu Ser Ile Pro Gln Gly Phe Ser Val Val Lys Arg Ala Thr Ser
 405 410 415
 Glu Gln Phe Arg Trp Ile Glu Phe Lys Thr Asn Ala Asn Ala Gln Ile
 420 425 430

110

<222> (1)...(642)

<223> avenin

<400> 107

atg aag atc ttc ttc ttc tta gct ctc ctt gct ctg gta gtg agc gcc	48
Met Lys Ile Phe Phe Leu Ala Leu Leu Ala Leu Val Val Ser Ala	
1 5 10 15	
acc ttt gca caa tat gca gaa tct gac ggt agt tat gag gaa gtg gag	96
Thr Phe Ala Gln Tyr Ala Glu Ser Asp Gly Ser Tyr Glu Glu Val Glu	
20 25 30	
ggt tct cat gat cga tgc caa caa cat cag atg aag ctg gac tct tgc	144
Gly Ser His Asp Arg Cys Gln Gln His Gln Met Lys Leu Asp Ser Cys	
35 40 45	
aga gag tac gtg gcg gag cgg tgc aca acg atg aga gat ttt ccg atc	192
Arg Glu Tyr Val Ala Glu Arg Cys Thr Thr Met Arg Asp Phe Pro Ile	
50 55 60	
acc tgg cca tgg aaa tgg tgg aag ggt ggt tgc gag gag ctc cgc aat	240
Thr Trp Pro Trp Lys Trp Lys Gly Gly Cys Glu Glu Leu Arg Asn	
65 70 75 80	
gag tgc tgc caa ctg ttg ggc cag atg cca tcg gag tgt cgc tgt gat	288
Glu Cys Cys Gln Leu Leu Gly Gln Met Pro Ser Glu Cys Arg Cys Asp	
85 90 95	
gcg att tgg aga tca atc cag cgc gag ctt ggt ggc ttc ttt gga act	336
Ala Ile Trp Arg Ser Ile Gln Arg Glu Leu Gly Phe Phe Gly Thr	
100 105 110	
caa caa ggt ctg ata ggg aaa agg ttg aag ata gcc aag agt ttg ccc	384
Gln Gln Gly Leu Ile Gly Lys Arg Leu Lys Ile Ala Lys Ser Leu Pro	
115 120 125	
acg cag tca aca tgg gcc ctg agt gca ata tcc cca aac tcc atg gtt	432
Thr Gln Ser Thr Trp Ala Leu Ser Ala Ile Ser Pro Asn Ser Met Val	
130 135 140	
agc cac att gct gga aag agc tcc att ctt cgt gcc ttg ccc gtg gat	480
Ser His Ile Ala Gly Lys Ser Ser Ile Leu Arg Ala Leu Pro Val Asp	
145 150 155 160	
gtc ctc gcc aat gca tac cgc att tcc agg caa gaa gcc cga aac ctc	528
Val Leu Ala Asn Ala Tyr Arg Ile Ser Arg Gln Glu Ala Arg Asn Leu	
165 170 175	
aaa aac aac agg gga caa gag tct ggt gta ttc act cca aaa ttt acc	576
Lys Asn Asn Arg Gly Gln Glu Ser Gly Val Phe Thr Pro Lys Phe Thr	
180 185 190	
caa acg agc ttc caa cct tat cca gag ggc gag gat gag tca tct ttg	624
Gln Thr Ser Phe Gln Pro Tyr Pro Glu Gly Glu Asp Glu Ser Ser Leu	
195 200 205	
att aat aag gca tca gag taa	645
Ile Asn Lys Ala Ser Glu	
210	
<210> 108	
<211> 214	
<212> PRT	
<213> Avena sativa	
<400> 108	
Met Lys Ile Phe Phe Leu Ala Leu Leu Ala Leu Val Val Ser Ala	
1 5 10 15	

111

Thr Phe Ala Gln Tyr Ala Glu Ser Asp Gly Ser Tyr Glu Glu Val Glu
 20 25 30
 Gly Ser His Asp Arg Cys Gln Gln His Gln Met Lys Leu Asp Ser Cys
 35 40 45
 Arg Glu Tyr Val Ala Glu Arg Cys Thr Thr Met Arg Asp Phe Pro Ile
 50 55 60
 Thr Trp Pro Trp Lys Trp Trp Lys Gly Gly Cys Glu Glu Leu Arg Asn
 65 70 75 80
 Glu Cys Cys Gln Leu Leu Gly Gln Met Pro Ser Glu Cys Arg Cys Asp
 85 90 95
 Ala Ile Trp Arg Ser Ile Gln Arg Glu Leu Gly Phe Phe Gly Thr
 100 105 110
 Gln Gln Gly Leu Ile Gly Lys Arg Leu Lys Ile Ala Lys Ser Leu Pro
 115 120 125
 Thr Gln Ser Thr Trp Ala Leu Ser Ala Ile Ser Pro Asn Ser Met Val
 130 135 140
 Ser His Ile Ala Gly Lys Ser Ser Ile Leu Arg Ala Leu Pro Val Asp
 145 150 155 160
 Val Leu Ala Asn Ala Tyr Arg Ile Ser Arg Gln Glu Ala Arg Asn Leu
 165 170 175
 Lys Asn Asn Arg Gly Gln Glu Ser Gly Val Phe Thr Pro Lys Phe Thr
 180 185 190
 Gln Thr Ser Phe Gln Pro Tyr Pro Glu Gly Glu Asp Glu Ser Ser Leu
 195 200 205
 Ile Asn Lys Ala Ser Glu
 210

<210> 109
 <211> 1044
 <212> DNA
 <213> Hordeum vulgare

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1041)
 <223> c-hordein

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (481)..(482)
 <223> /transl_except=(pos:481..483,aa:OTHER)

<400> 109
 atg aag acg ttc ctc acc ttt gtc ctc ctt gcc atg gcg atg agc atc 48
 Met Lys Thr Phe Leu Thr Phe Val Leu Leu Ala Met Ala Met Ser Ile
 1 5 10 15
 gtc act acc gct agg cag cta aac cct agc cac caa gag ttg caa tca 96
 Val Thr Thr Ala Arg Gln Leu Asn Pro Ser His Gln Glu Leu Gln Ser
 20 25 30
 cca caa caa cca ttt ctg aaa caa caa tca tat ctg caa caa cca tat 144
 Pro Gln Gln Pro Phe Leu Lys Gln Gln Ser Tyr Leu Gln Gln Pro Tyr
 35 40 45

cca caa caa cca tat cta ccg cag caa cca ttc ccc aca ccc caa caa	192
Pro Gln Gln Pro Tyr Leu Pro Gln Gln Pro Phe Pro Thr Pro Gln Gln	
50 55 60	
ttt ttc ccc tat cta cca cag caa aca ttt ccc cca tcc caa caa cca	240
Phe Phe Pro Tyr Leu Pro Gln Gln Thr Phe Pro Pro Ser Gln Gln Pro	
65 70 75 80	
aac ccc cta caa cca caa cca ttc ccc ctg caa ccc caa cca cca	288
Asn Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro Gln Pro Pro	
85 90 95	
caa caa cct ttt cct cag ccc caa caa cca aat ccc cag caa cca caa	336
Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Pro Asn Pro Gln Gln Pro Gln	
100 105 110	
caa cct ttc ccc cggtt cca caa caa ata gta ccc cag caa cca caa	384
Gln Pro Phe Pro Arg Gln Pro Gln Gln Ile Val Pro Gln Gln Pro Gln	
115 120 125	
caa cca ttc cct cag caa cca caa cct ttt cct cag ccc caa caa	432
Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Gln	
130 135 140	
cca ttc tct tgg caa cca caa cca ttt ctc cag ccc cta caa cta	480
Pro Phe Ser Trp Gln Pro Gln Gln Pro Phe Leu Gln Pro Leu Gln Leu	
145 150 155 160	
tag ccc ctg caa gca caa caa cca ttc ccc ttg caa cct caa cta cca	528
Pro Leu Gln Ala Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro Gln Leu Pro	
165 170 175	
ttt ccg caa ccc caa caa cca att gga cag caa cca aaa caa cca ctc	576
Phe Pro Gln Pro Gln Gln Pro Ile Gly Gln Gln Pro Lys Gln Pro Leu	
180 185 190	
ctg cag caa cca caa caa aca att ccc cag caa cca caa cca cca ttc	624
Leu Gln Gln Pro Gln Gln Thr Ile Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe	
195 200 205	
ccc ctg cag ccgtt caa caa cca ttc ccc caa caa cca caa cca cca ctt	672
Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Leu	
210 215 220	
ccc caa caa ccc caa caa ata att tcc cag caa ccc caa caa cca ttc	720
Pro Gln Gln Pro Gln Gln Ile Ile Ser Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe	
225 230 235 240	
cct cta caa cct caa caa cca ttc ccc caa ccc caa cca ttc ccc cag	768
Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Pro Phe Pro Gln	
245 250 255	
gag caa ccc caa caa gca ttc ccc cta caa ccgtt cca caa cca ttc ccc	816
Glu Gln Pro Gln Gln Ala Phe Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro	
260 265 270	
gag gaa tca gaa caa ata att acc caa caa cca ttc cct cta caa cca	864
Glu Glu Ser Glu Gln Ile Ile Thr Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro	
275 280 285	
caa caa ctg ttc ccc cag caa cca caa cca ctt ccc cag ccc caa	912
Gln Gln Leu Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Leu Pro Gln Pro Gln	
290 295 300	
caa cca ttc cgc caa cta cca aaa tat ata att ccc cag caa cct caa	960
Gln Pro Phe Arg Gln Leu Pro Lys Tyr Ile Ile Pro Gln Gln Pro Gln	
305 310 315 320	

113

caa cca ttc ctt ctg caa cca cac caa cct cag caa cct tat gca caa 1008
 Gln Pro Phe Leu Leu Gln Pro His Gln Pro Gln Gln Pro Tyr Ala Gln
 325 330 335
 caa gac atc tgg agt gat ata gcc ctc ttg ggc taa 1044
 Gln Asp Ile Trp Ser Asp Ile Ala Leu Leu Gly
 340 345
 <210> 110
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare
 <400> 110
 Met Lys Thr Phe Leu Thr Phe Val Leu Leu Ala Met Ala Met Ser Ile
 1 5 10 15
 Val Thr Thr Ala Arg Gln Leu Asn Pro Ser His Gln Glu Leu Gln Ser
 20 25 30
 Pro Gln Gln Pro Phe Leu Lys Gln Gln Ser Tyr Leu Gln Gln Pro Tyr
 35 40 45
 Pro Gln Gln Pro Tyr Leu Pro Gln Gln Pro Phe Pro Thr Pro Gln Gln
 50 55 60
 Phe Phe Pro Tyr Leu Pro Gln Gln Thr Phe Pro Pro Ser Gln Gln Pro
 65 70 75 80
 Asn Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro Gln Pro Pro
 85 90 95
 Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Gln Pro Asn Pro Gln Gln Pro Gln
 100 105 110
 Gln Pro Phe Pro Arg Gln Pro Gln Gln Ile Val Pro Gln Gln Pro Gln
 115 120 125
 Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Gln
 130 135 140
 Pro Phe Ser Trp Gln Pro Gln Gln Pro Phe Leu Gln Pro Leu Gln Leu
 145 150 155 160
 <210> 111
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare
 <400> 111
 Pro Leu Gln Ala Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro Gln Leu Pro Phe
 1 5 10 15
 Pro Gln Pro Gln Gln Pro Ile Gly Gln Gln Pro Lys Gln Pro Leu Leu
 20 25 30
 Gln Gln Pro Gln Gln Thr Ile Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro
 35 40 45
 Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Leu Pro
 50 55 60
 Gln Gln Pro Gln Gln Ile Ile Ser Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro
 65 70 75 80
 Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Pro Phe Pro Gln Glu
 85 90 95
 Gln Pro Gln Gln Ala Phe Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Glu
 100 105 110
 Glu Ser Glu Gln Ile Ile Thr Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro Gln
 115 120 125
 Gln Leu Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Leu Pro Gln Pro Gln Gln
 130 135 140
 Pro Phe Arg Gln Leu Pro Lys Tyr Ile Ile Pro Gln Gln Pro Gln Gln
 145 150 155 160

<210> 112
 <211> 924
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(921)
 <223> glutenin-1D1
 <400> 112

atg	aag	acc	tcc	ctc	gtc	ttt	gcc	ctc	gtc	gcc	gtt	gct	gct	aca	agt		48
Met	Lys	Thr	Phe	Leu	Val	Phe	Ala	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	Ala	Thr	Ser		
1				5					10						15		
gca	att	gct	cag	atg	gag	act	aga	tgc	atc	cct	ggt	ttg	gag	aga	cca		96
Ala	Ile	Ala	Gln	Met	Glu	Thr	Arg	Cys	Ile	Pro	Gly	Leu	Glu	Arg	Pro		
						20			25						30		
tgg	cag	cag	caa	cca	tta	cca	cca	cag	aca	ttt	cca	caa	caa	cca			144
Trp	Gln	Gln	Gln	Pro	Leu	Pro	Pro	Gln	Gln	Thr	Phe	Pro	Gln	Gln	Pro		
						35			40						45		
cta	ttt	tca	caa	caa	caa	caa	caa	caa	cta	ttt	cct	caa	caa	cca	tca		192
Leu	Phe	Ser	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Leu	Phe	Pro	Gln	Gln	Pro	Ser		
						50			55						60		
ttt	tcg	cag	caa	caa	cca	cca	ttt	tgg	cag	caa	caa	cca	cca	ttt	tct		240
Phe	Ser	Gln	Gln	Gln	Pro	Pro	Phe	Trp	Gln	Gln	Gln	Pro	Pro	Pro	Phe	Ser	
						65			70						75		80
cag	caa	caa	cca	att	cta	cca	cag	caa	cca	ttt	tcg	cag	caa	caa			288
Gln	Gln	Gln	Pro	Ile	Leu	Pro	Gln	Gln	Pro	Pro	Phe	Ser	Gln	Gln	Gln		
						85			90						95		
caa	cta	gtt	cta	ccg	caa	caa	cca	cca	ttt	tca	cag	caa	caa	cca			336
Gln	Leu	Val	Leu	Pro	Gln	Gln	Pro	Pro	Phe	Ser	Gln	Gln	Gln	Gln	Pro		
						100			105						110		
gtt	tta	cct	cca	caa	caa	tca	cct	ttt	cca	caa	caa	caa	caa	caa	cac		384
Val	Leu	Pro	Pro	Gln	Gln	Ser	Pro	Phe	Pro	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	His		
						115			120						125		
caa	cag	ctg	gtg	caa	caa	atc	cct	gtt	cag	cca	tcc	att	ttg				432
Gln	Gln	Leu	Val	Gln	Gln	Ile	Pro	Val	Val	Gln	Pro	Ser	Ile	Leu			
						130			135						140		
cag	cag	cta	aac	cca	tgc	aag	gta	tcc	ctc	cag	cag	tgc	agc	cct			480
Gln	Gln	Leu	Asn	Pro	Cys	Lys	Val	Phe	Leu	Gln	Gln	Gln	Cys	Ser	Pro		
						145			150						155		160
gtg	gca	atg	cca	caa	cgt	ctt	gct	agg	tgc	caa	atg	ttg	cag	cag	agc		528
Val	Ala	Met	Pro	Gln	Arg	Leu	Ala	Arg	Ser	Gln	Met	Leu	Gln	Gln	Ser		
						165			170						175		
agt	tgc	cat	gtg	atg	caa	caa	caa	tgt	tgc	cag	cag	ttg	ccg	caa	atc		576
Ser	Cys	His	Val	Met	Gln	Gln	Gln	Cys	Cys	Gln	Gln	Leu	Pro	Gln	Ile		
						180			185						190		
ccc	cag	caa	tcc	cgc	tat	gag	gca	atc	cgt	gct	atc	atc	tac	tcc	atc		624
Pro	Gln	Gln	Ser	Arg	Tyr	Glu	Ala	Ile	Arg	Ala	Ile	Ile	Tyr	Ser	Ile		
						195			200						205		

115

atc ctg caa gaa caa caa cag gtt cag ggt tcc atc caa tct cag cag		672
Ile Leu Gln Glu Gln Gln Val Gln Gly Ser Ile Gln Ser Gln Gln		
210 215 220		
cag caa ccc caa cag ttg ggc caa tgt gtt tcc caa ccc caa cag cag		720
Gln Gln Pro Gln Gln Leu Gly Gln Cys Val Ser Gln Pro Gln Gln Gln		
225 230 235 240		
tcg cag cag caa ctc ggg caa caa cct caa caa caa ttg gca cag		768
Ser Gln Gln Leu Gly Gln Pro Gln Gln Gln Leu Ala Gln		
245 250 255		
ggt acc ttt ttg cag cca cac cag ata gct cag ctt gag gtg atg act		816
Gly Thr Phe Leu Gln Pro His Gln Ile Ala Gln Leu Glu Val Met Thr		
260 265 270		
tcc att gcg ctc cgt atc ctg cca acg atg tgc agt gtt aat gtg ccg		864
Ser Ile Ala Leu Arg Ile Leu Pro Thr Met Cys Ser Val Asn Val Pro		
275 280 285		
ttg tac aga acc acc act agt gtg cca ttc ggc gtt ggc acc gga gtt		912
Leu Tyr Arg Thr Thr Ser Val Pro Phe Gly Val Gly Thr Gly Val		
290 295 300		
ggt gcc tac tga		924
Gly Ala Tyr		
305		
<210> 113		
<211> 307		
<212> PRT		
<213> Triticum aestivum		
<400> 113		
Met Lys Thr Phe Leu Val Phe Ala Leu Leu Ala Val Ala Ala Thr Ser		
1 5 10 15		
Ala Ile Ala Gln Met Glu Thr Arg Cys Ile Pro Gly Leu Glu Arg Pro		
20 25 30		
Trp Gln Gln Pro Leu Pro Pro Gln Gln Thr Phe Pro Gln Gln Pro		
35 40 45		
Leu Phe Ser Gln Gln Gln Gln Gln Leu Phe Pro Gln Gln Pro Ser		
50 55 60		
Phe Ser Gln Gln Gln Pro Pro Phe Trp Gln Gln Pro Pro Phe Ser		
65 70 75 80		
Gln Gln Gln Pro Ile Leu Pro Gln Gln Pro Pro Phe Ser Gln Gln Gln		
85 90 95		
Gln Leu Val Leu Pro Gln Gln Pro Pro Phe Ser Gln Gln Gln Pro		
100 105 110		
Val Leu Pro Pro Gln Gln Ser Pro Phe Pro Gln Gln Gln Gln His		
115 120 125		
Gln Gln Leu Val Gln Gln Ile Pro Val Val Gln Pro Ser Ile Leu		
130 135 140		
Gln Gln Leu Asn Pro Cys Lys Val Phe Leu Gln Gln Cys Ser Pro		
145 150 155 160		
Val Ala Met Pro Gln Arg Leu Ala Arg Ser Gln Met Leu Gln Gln Ser		
165 170 175		
Ser Cys His Val Met Gln Gln Gln Cys Cys Gln Gln Leu Pro Gln Ile		
180 185 190		

116

Pro Gln Gln Ser Arg Tyr Glu Ala Ile Arg Ala Ile Ile Tyr Ser Ile
 195 200 205
 Ile Leu Gln Glu Gln Gln Val Gln Gly Ser Ile Gln Ser Gln Gln
 210 215 220
 Gln Gln Pro Gln Gln Leu Gly Gln Cys Val Ser Gln Pro Gln Gln Gln
 225 230 235 240
 Ser Gln Gln Gln Leu Gly Gln Gln Pro Gln Gln Gln Leu Ala Gln
 245 250 255
 Gly Thr Phe Leu Gln Pro His Gln Ile Ala Gln Leu Glu Val Met Thr
 260 265 270
 Ser Ile Ala Leu Arg Ile Leu Pro Thr Met Cys Ser Val Asn Val Pro
 275 280 285
 Leu Tyr Arg Thr Thr Ser Val Pro Phe Gly Val Gly Thr Gly Val
 290 295 300
 Gly Ala Tyr
 305

<210> 114

<211> 8482

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: binary expression vector

<400> 114

ttccatggac atacaatgg acgaacggat aaacctttc acgccctttt aaatatccga 60
 ttattcta ataaacgctttt ttctcttagg tttaccgc aatataatccgt gtcaaacact 120
 gatagttta actgaaggcg ggaaacgaca atcagatcta gtaggaaaca gctatgacca 180
 tgattacgcc aatcaccact ttgtacaaga aagctgggtc tagatgacgg acaatcagta 240
 aattgaacgg agaatattat tcataaaaaat acgatagtaa cgggtgatat attcattaga 300
 atgaaccgaa accggcggta aggatcttag ctacacatgc tcaggtttt tacaacgtgc 360
 acaacagaat taaaagcaaa tatcatgcga tcataaggcgct ctcgcataatc tcattaaagc 420
 aggaggccctt cttagactgca ggcggccccc caccgcggtg ggctggctat gaagaaatta 480
 taatcgtgta aaacttagtg agtgtgtatg aatgaaagta ttgcaaaatc ctcattatat 540
 agactacatg cataactagt tgcataatgg tttgtgtttt tcttcattat tgcatcctcc 600
 aagtggatgt catgttttta cacatggctt ccatgcaaat catttccaaa atattttaa 660
 actttccaca gggcatccat gcatgcaccc caaaacttgt gtgtggtaac attgttgtct 720
 taaaaaatta ctaaaccttt tgcacatgt acgttcatgc acctcaaaatc ttgtgtggta 780
 ccattattat cctcaagaat tattgaatgt ttgggtata tgccatccat gcagcattgc 840
 aacaattaaa tctccaaacc ttgtggtacc atattcaatc actttaattc tcctatagta 900
 gaaatattag caaatattta catttccagt tgatttagt atgtatttag aagacaaaaaa 960
 taatttagaa tcaattaatc aacttgcaaa ttgctaagtg ttggcaaaatc ttgcataaaa 1020
 aggtgttata aatttagtac caaatataaa aatttatcgc aaatcaaata cataacacac 1080
 atagaaaaac aaaaacaaat tacaagggtt tagacgttta gtggcaatgt gtaaatttgc 1140
 tcgactgaat tggccctttt aaggcctgtt tttgtacaa acttgtgata attcaactggc 1200
 cgtcgttta caacgactca ggatcctgtc aaacactgtat agtttaact gaaggcggga 1260
 aacgacaatc tgatcatgag cggagaatta agggagtcac gttatgaccc cccgcgttga 1320
 cgccggacaa gccgttttac gtttggact gacagaaccg caacgttga ggagccactc 1380
 agccgcgggt ttctggagtt taatgagcta agcacatacg tcagaaacca ttattgcgc 1440
 ttcaaaaatgc gcctaagggtc actatcgtt agccaaatatt tcttgcgtt aatgctccac 1500
 tgacgttcca taaaatcccc tcggtatcca attagagtct catattcaatctcaatccaa 1560
 ataatctgca ccggatctgg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt gcacgcagg 1620
 tctccggccg cttgggtgaa gaggcttattc ggctatgact gggcacaaca gacaatccgc 1680

tgctctgatg ccggcgtgtt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag 1740
 accgacctgt ccgggtccct gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct atcggttgc 1800
 gcccacgacgg gegttccttg cgcaagctgt ctcgacgttgc tcactgaagc gggaaaggac 1860
 tggctgctat tggcgaaagt gcccggcag gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc 1920
 gagaaaatgat ccattcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga tccggctacc 1980
 tgcccattcg accaccaagc gaaacatcg atcgagcgg cacgtactcg gatggaaagcc 2040
 ggtcttgcg atcaggatga tctggacgaa gggatcagg ggctcgcc agccgaactg 2100
 ttgcgcaggc tcaaggcgcg catgcccac gggaggatc tgctgtgac ccatggcgat 2160
 gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgcttt ctggattcat cgactgtggc 2220
 cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctacccgtga tattgctgaa 2280
 gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcctc ctgtgtgtt acggtatcgc cgctcccgat 2340
 tcgcagcgc tgcgccttcta tagatcttgc tgcgttgcgaa gatcgttcaaa acatttggca 2400
 gatcgttcaa acatttggca ataaagtttca ttaagattga atcctgttgc cggttgcg 2520
 atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc 2580
 atgacgttat ttatgagatg ggttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 2640
 gcgatagaaa acaaaaatata gcgcgcaaac tagataaaat tatcgccgc ggtgtcatct 2700
 atgttacttag atcgggcctc ctgtcaagct ctgtgtggta ataattgtca ttagattgtt 2760
 ttatgcata gatgcactcg tcagttacatt aaagacgtcc accacaatat atcctgccac 2820
 atcaccacgc gttaccacca aatcggcca atttagaca agtataaacc ggtatgttaat 2880
 tgccgagttc gagcgttccc taatcatcga cccgacccgg akgcggcgcg aggccgcca 3060
 gggccgaggc gtgaagtttgc gccccccccc taccctcacc cccgcacaga tcgcgcacgc 3120
 cccgcgactg atcgaccagg aaggccgcac cgtaaaagag gcccgtgcac tgcttgcgt 3180
 gcatcgctcg accctgttacc ggcacttga ggcagcgg gaaatgtacgc ccaccgaggc 3240
 caggcggcgc ggtgccttcc gtgaggacgc attgaccgg gccgacgccc tggcggccgc 3300
 cgagaatgaa cgccaaagagg aacaagcatg aaaccgcacc aggacggcca ggacgaaccg 3360
 ttttcattt ccgaagagat cgaggcggatg atgatcgccg cccgttacgt gttcgagccg 3420
 cccgcgcacg tctcaaccgt gcccgttccctt gggccgcgtt gaaatcctgg cccgtttgtc tgatgccaag 3480
 ctggcggcctt ggccggccag tttggccgt gaagaaaccg agcgcgcgcg tctaaaaagg 3540
 tggatgttat ttgagtaaaa cagcttgcgt catcggtcg ctgcgttatat gatgcgtatga 3600
 gtaaataaaac aaatacgc当地 ggggaacgca tgaagggtt cgctgtactt aaccagaaag 3660
 gcccgtcagg caagacgacc atcgcaaccc atctagcccg cggccctgcaa ctgcgggggg 3720
 ccgatgttct gttagtcgtatcccgatcccg aggccgtgc cccgcattgg gcccgtgc 3780
 gggaaagatca accgcctaacc gttgtcgca tcgaccgccc gacgattgac cgccacgtga 3840
 aggccatcgg cccgcgcac ttcgtatgtc tcgacggagc gcccaggcg gcccgttgg 3900
 ctgtgtccgc gatcaaggca gccgacttcg tgctgattcc ggtgcagcca agcccttacg 3960
 acatatgggc caccgcgcac ctgggtggagc tggtaagca ggcgcatttag gtcacggatg 4020
 gaaggctaca agcggcttt gtcgtgtcg gggcgatcaa aggcacgcgc atcggcgttgc 4080
 aggttgc当地 ggcgtggcc gggtacgac tgccattct tgagtccctt atcacgc当地 4140
 ggcgtgacta cccaggcact gccgcgc当地 gcacaaccgt tcttgaatca gaacccgagg 4200
 ggcacgc当地 cccgcaggc当地 caggcgttgc cccgttacat taaatcaaaa ctcatttgc当地 4260
 ttaatgaggt aaagagaaaa tgacaaaatg cacaatgc当地 ctaagtgc当地 gcccgtccgag 4320
 cgcacgc当地 agcaaggctg caacgttgc caggcgttgc gacacgc当地 ccatgaagcg 4380
 ggtcaactt cagttgc当地 cggaggatca caccaagctg aagatgtacg cggtaacgc当地 4440
 aggcaagacc attaccgagc tgctatctga atacatgc当地 cagcttaccag agtaaatgag 4500
 caaatgaata aatgagtaga tgaattttgc cggctaaagg aggccgtatg gaaaatcaag 4560
 aacaaccagg caccgc当地 gtggatgcc ccatgtgtgg aggaacgggc ggttggccag 4620
 gcgtaagcgg ctgggttgc tgccggccct gcaatggc当地 tggaaacccccc aagccgagg 4680
 aatcggc当地 agcgtc当地 aaccatccgg cccgttacaa atcggc当地 cgctgggtga 4740
 tgacctggc当地 gagaagttga aggccgc当地 gcccgc当地 cggcaacgc当地 tcgaggc当地 4800
 agcacgc当地 ggtgaatcgt ggcaagc当地 cgctgatgc当地 atccgc当地 aatccgc当地 4860
 accgc当地 gggc当地 gccgtgc当地 cgtcgattag gaagccgc当地 aaggccgacg agcaaccaga 4920
 tttttc当地 ccgatgttgc当地 atgacgtggg caccgc当地 agtc当地 cagca local 4980
 gccc当地 ttttgc当地 cgtc当地 gacgc当地 acgagc当地 gaggtgatcc gctacgagct 5040
 tccagacggg cacgttagagg tttccgc当地 gccc当地 cggc当地 atggcc当地 cgttggattt 5100

cgacacctggtt ctgatggcggtttccatct aaccgaatcc atgaaccgat accgggaagg 5160
 gaagggagac aagcccgccc gcgtgttccgtcccacacgtt gcggacgtac tcaagttctg 5220
 cccggcggcc gatggcgaa agcagaaaaga cgacacctggtt aaaaacctgca ttccgttaaa 5280
 caccacgcac gttccatgc acggtacgaa gaaggccaag aacggccccc tggtgacggt 5340
 atcccgagggtt gaagccttga tttagccgttca caagatcgta aagagcgaaa ccggccggcc 5400
 ggagtacatc gagatcgagc tagctgattt gatgtaccgc gagatcacag aaggcaagaa 5460
 cccggacgttgcgtt ctgacggttt acccccattt cttttgcattt gatcccggca tcggccgtt 5520
 tcttaccgc ctggcacgc ggcggcaggcaaggcaaggaa gcccagatgtt tggtcaagac 5580
 gatctacgaa cgcatggca ggcgggaga gttcaagaag ttctgttca ccgtgcgcaa 5640
 gctgatcggttccaaatgacc tgccggagta cgatttgaag gaggaggcgg ggcaggctgg 5700
 cccgatccta gtcatgcgtt acccgcaacct gatcgaggcgaagcatcccg ccggttccata 5760
 atgtacggag cagatgttag ggccaaatttc cctagcaggg gaaaaaggtc gaaaaggct 5820
 ctttcctgtt gatagcacgtt acattggaa cccaaagccg tacattggaa accggaaacc 5880
 gtacattggaa accccaaagc cgtacattgg gaaccggta cacatgttaa tgactgat 5940
 aaaagagaaa aaaggcgatt ttccgccta aaactcttta aaacttatta aaactcttaa 6000
 aacccgcctt gcctgtcat aactgtcttgc ccagcgacca gccgaagagc tgcaaaaagc 6060
 gcctaccctt cggtcgttc gtccttacg cccggccgtt tcgcgtcggc ctatcgccg 6120
 cgctggccgc tcaaaaatgg ctggccttacg gccaggcaat ctaccaggcgc gcggacaagc 6180
 cgcgcgtcg ccactcgacc gcccggccccc acatcaaggc accctgcctc ggcgcgttgc 6240
 gtatgtacgg tgaaaaaccc tcacatgtc agctcccgga gacggtcaca gcttgtctgt 6300
 aagcgatgc cgggagcaga caagccgtc agggcggtc agcgggtgtt ggccgggtgc 6360
 gggggcgcagc catgaccaggc tcaacgttagc atagoggagt gtataactggc ttaactatgc 6420
 ggcacatcagc cagattgtac tgagagtgc ccatatcggt tgcgttgc tgcacatgc 6480
 cgttaaggaga aaataccgc tcaggcgctc ttccgccttcc tcgcgtactc actcgctgc 6540
 ctcggctgtt cggctgcggc gagcggttac agctcactca aaggcggtaa tacggtttac 6600
 cacagaatca ggggataacg cagggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag 6660
 gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggtt ttccatagg ctccgccttcc ctgcgttgc 6720
 tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggtt gcgaaaaccgg acaggactat aaagatacca 6780
 ggcgttccc cctggaaagct ccctcggtcg ctctctgtt ccgcaccctgc cgcttaccgg 6840
 atacctgtcc gccttctcc ctccggaaag cgtggcgctt tctctatgtt cactgttgc 6900
 gtatctcgtt cgggtgttgc tgcttcgtc caagctggc tgcgttgcacg aaccccccgt 6960
 tcagccgcac cgctgcgttcttatccgttta ctatcgctt gatgttcaacc cggtaagaca 7020
 cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagaggca ggtatgttgc 7080
 cgggtctaca gagtttttgc agtgggtggcc taactacggc tacactagaa ggacagtatt 7140
 tggtatctgc gctctgttgc agccagtttac ctccggaaaa agagttgtt gctcttgatc 7200
 cggcaaaacaa accaccgcgtt gtagcggttgc ttccgttgc tgcaaggcagc agattacgc 7260
 cagaaaaaaaaa ggatctcaag aagatcctt gatcttttgc acggggctcg acgctcgttgc 7320
 gaacgaaaac tcacgtttaag ggatcttgc catgtatgtt atatctccaa atttgttgc 7380
 ggcttattat gcacgtttaaa aaataataaa agcagacttgc acctgtatgtt ttggctgttgc 7440
 gcaattatgt gcttagtgc tctaaccgtt gagtttgc ggcggccggaa gcccgtcgg 7500
 cttgaacgaa ttcttagtca gacatttttgc gccgactacc ttgggtatct cgccttgcac 7560
 gtagtggaca aattcttcca actgtatgtc ggcggaggcc aagcgatctt ctctttgtcc 7620
 aagataagcc tgcgttgc tcaagtatgtac gggctgtatgtt gggccggca ggcgtccat 7680
 tgcccagtcg gcacgttgc cttccggcgtt gatcttgc gttactgtcgc tgcgttgc 7740
 gcgggacaaac gtaacgttca catttcgttca atcgccagcc cagtcggcgc gcgagttcca 7800
 tagcggttgc gtttcatttgc ggcgttcaaa tagatcgttgc tccggaaaccg gatcaaaagag 7860
 ttccctccggc gctggacca ccaaggcaac gctatgttgc ttgcgttgc tccggaaaccg 7920
 agccagatca atgtcgatcg tggctggctt gaaatgttgc gcaagaatgtt cattcgctg 7980
 ccattctcca aattcgatcg cgcgttgc tggataacgc cacggaaatgt tgcgttgc 8040
 cacaacaatcg tgcgttgc tcaaggcgttgc aatctcgatc tctccagggg aagccgaagt 8100
 ttccaaaagg tcgttgc tcaaggcgttgc cgttgc tcaaggcgttgc cggtcaccgt 8160
 aaccagcaaa tcaatatcactt gttgtggctt cggccgttca tccactgtcgg agccgtacaa 8220
 atgtacggcc agcaacgtcg tttcgatgt ggcgttgc gatgttgc acgccaacta cctctgtat 8280
 ttgagtcgttgc tccggcgttca cccatgtatgtt ttaacttttgc ttttagggcg 8340
 actggccctgc tgcgttgc tccggcgttca cccatgtatgtt ttaacttttgc ttttagggcg 8400
 acgcttgc tgcgttgc tccggaggcat agactgttgc ccaaaaaaac agtcataaca 8460
 agccatgaaa accggccacttgc 8482

<210> 115
 <211> 575
 <212> DNA
 <213> Brassica napus
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(6)
 <223> restriction site
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (570)..(575)
 <223> restriction site
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(575)
 <223> coding for homogentisate-1,2-dioxygenase (HDG)
 <400> 115
 gtgcacgggc cgatgggggc gaagggtctt gctgcaccaa gagattttct tgcaccaacg 60
 gcatggtttg aggaagggtc acggcctgac tacactattt ttcaagaagtt tggcggtgaa 120
 ctctttactg ctaaacaaga tttctctccg ttcaatgtgg ttgcctggca tggcaattac 180
 gtgccttata agtatgacct gcacaaggtc tgccatata acactgtcct ttagaccat 240
 ggagatccat ctgtaaatac agttctgaca gcaccaacgg ataaacctgg tggcccttg 300
 cttgattttt tcataattccc tcctcggtgg ttggttgctg agcataacctt tcgacccct 360
 tactaccatc gtaactgcat gagtgaattt atgggcctaa tctatggtgc ttacgaggcc 420
 aaagctgtg gatttctacc tggtggcgca agtcttcaca gttgtatgac acctcatggt 480
 ccagatacaa ccacatacga ggcgacgatt gctcgtgtaa atgcaatggc tccttataag 540
 ctcacaggca ccatggcctt catgttttagt gtacc 575
 <210> 116
 <211> 1386
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1383)
 <223> coding for homogentisate-1,2-dioxygenase (HDG)
 <400> 116
 atg gaa gag aag aag gag ctt gaa gag ttg aag tat caa tca ggt 48
 Met Glu Lys Lys Lys Glu Leu Glu Leu Lys Tyr Gln Ser Gly
 1 5 10 15
 ttt ggt aac cac ttc tca tcg gaa gca atc gcc gga gct tta ccg tta 96
 Phe Gly Asn His Phe Ser Ser Glu Ala Ile Ala Gly Ala Leu Pro Leu
 20 25 30
 gat cag aac agt cct ctt tgt cct tac ggt ctt tac gcc gaa cag 144
 Asp Gln Asn Ser Pro Leu Leu Cys Pro Tyr Gly Leu Tyr Ala Glu Gln
 35 40 45
 atc tcc ggt act tct ttc act tct cct cgc aag ctc aat caa aga agt 192
 Ile Ser Gly Thr Ser Phe Thr Ser Pro Arg Lys Leu Asn Gln Arg Ser
 50 55 60
 tgg ttg tac cgg gtt aaa cca tcg gtt aca cat gaa ccg ttc aag cct 240
 Trp Leu Tyr Arg Val Lys Pro Ser Val Thr His Glu Pro Phe Lys Pro
 65 70 75 80
 cgt gta cca gct cat aag aag ctt gtg agt gag ttt gat gca tca aat 288
 Arg Val Pro Ala His Lys Lys Leu Val Ser Glu Phe Asp Ala Ser Asn
 85 90 95

120

agt cgt acg aat ccg act cag ctt cg ^g tgg aga cct gag gat att cct		336	
Ser Arg Thr Asn Pro Thr Gln Leu Arg Trp Arg Pro Glu Asp Ile Pro			
100	105	110	
gat tcg gag att gat ttc gtt gat ggg tta ttt acc att tgt gga gct		384	
Asp Ser Glu Ile Asp Phe Val Asp Gly Leu Phe Thr Ile Cys Gly Ala			
115	120	125	
gga agc tcg ttt ctt cgc cat ggc ttc gct att cac atg tat gtg gct		432	
Gly Ser Ser Phe Leu Arg His Gly Phe Ala Ile His Met Tyr Val Ala			
130	135	140	
aac aca gga atg aaa gac tcc gca ttt tgc aac gct gat ggt gac ttc		480	
Asn Thr Gly Met Lys Asp Ser Ala Phe Cys Asn Ala Asp Gly Asp Phe			
145	150	155	160
ttg tta gtt cct caa aca gga agg cta tgg att gaa act gag tgt gga		528	
Leu Leu Val Pro Gln Thr Gly Arg Leu Trp Ile Glu Thr Glu Cys Gly			
165	170	175	
agg ctt ttg gta act cct ggt gag att gct gtt ata cca caa ggt ttc		576	
Arg Leu Leu Val Thr Pro Gly Glu Ile Ala Val Ile Pro Gln Gly Phe			
180	185	190	
cgt ttc tcc ata gat tta ccg gat ggg aag tct cgt ggt tat gtt gct		624	
Arg Phe Ser Ile Asp Leu Pro Asp Gly Lys Ser Arg Gly Tyr Val Ala			
195	200	205	
gaa atc tat ggg gct cat ttt cag ctt cct gat ctt gga cca ata ggt		672	
Glu Ile Tyr Gly Ala His Phe Gln Leu Pro Asp Leu Gly Pro Ile Gly			
210	215	220	
gct aat ggt ctt gct gca tca aga gat ttt ctt gca cca aca gca tgg		720	
Ala Asn Gly Leu Ala Ala Ser Arg Asp Phe Leu Ala Pro Thr Ala Trp			
225	230	235	240
ttt gag gat gga ttg cgg cct gaa tac aca att gtt cag aag ttt ggc		768	
Phe Glu Asp Gly Leu Arg Pro Glu Tyr Thr Ile Val Gln Phe Gly			
245	250	255	
ggt gaa ctc ttt act gct aaa caa gat ttc tct cca ttc aat gtg gtt		816	
Gly Glu Leu Phe Thr Ala Lys Gln Asp Phe Ser Pro Phe Asn Val Val			
260	265	270	
gcc tgg cat ggc aat tac gtg cct tat aag tat gac ctg aag aag ttc		864	
Ala Trp His Gly Asn Tyr Val Pro Tyr Lys Tyr Asp Leu Lys Lys Phe			
275	280	285	
tgt cca tac aac act gtg ctt tta gat cat gga gat cca tct ata aat		912	
Cys Pro Tyr Asn Thr Val Leu Leu Asp His Gly Asp Pro Ser Ile Asn			
290	295	300	
aca gtc ctt aca gca cca act gat aaa cct ggt gtg gcc ttg ctt gat		960	
Thr Val Leu Thr Ala Pro Thr Asp Lys Pro Gly Val Ala Leu Leu Asp			
305	310	315	320
ttt gtc ata ttt cct cct cga tgg ttg gtt gct gag cat act ttt cga		1008	
Phe Val Ile Phe Pro Pro Arg Trp Leu Val Ala Glu His Thr Phe Arg			
325	330	335	
cct cct tac tat cat cgt aac tgc atg agt gaa ttt atg ggc tta atc		1056	
Pro Pro Tyr Tyr His Arg Asn Cys Met Ser Glu Phe Met Gly Leu Ile			
340	345	350	
tac ggt gca tac gag gcg aaa gct gat gga ttt ctc cct ggc ggt gca		1104	
Tyr Gly Ala Tyr Glu Ala Lys Ala Asp Gly Phe Leu Pro Gly Gly Ala			
355	360	365	

121

agt ctt cat agc tgt atg aca cct cat ggt cca gat act acc acg tac 1152
 Ser Leu His Ser Cys Met Thr Pro His Gly Pro Asp Thr Thr Thr Tyr
 370 375 380
 gag gcg aca att gct cga gta aat gca atg gct cct tct aaa ctc aca 1200
 Glu Ala Thr Ile Ala Arg Val Asn Ala Met Ala Pro Ser Lys Leu Thr
 385 390 395 400
 ggt acg atg gct ttc atg ttc gaa tca gca ttg atc cct aga gtc tgt 1248
 Gly Thr Met Ala Phe Met Phe Glu Ser Ala Leu Ile Pro Arg Val Cys
 405 410 415
 cat tgg gct ctg gag tct cct ctg gat cac gac tac tac cag tgt 1296
 His Trp Ala Leu Glu Ser Pro Phe Leu Asp His Asp Tyr Tyr Gln Cys
 420 425 430
 tgg att ggc ctc aag tct cat ttc tcg cgc ata agc ttg gac aag aca 1344
 Trp Ile Gly Leu Lys Ser His Phe Ser Arg Ile Ser Leu Asp Lys Thr
 435 440 445
 aat gtt gaa tca aca gag aaa gaa cca gga gct tcg gag taa 1386
 Asn Val Glu Ser Thr Glu Lys Glu Pro Gly Ala Ser Glu
 450 455 460
 <210> 117
 <211> 461
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 117
 Met Glu Glu Lys Lys Lys Glu Leu Glu Glu Leu Lys Tyr Gln Ser Gly
 1 5 10 15
 Phe Gly Asn His Phe Ser Ser Glu Ala Ile Ala Gly Ala Leu Pro Leu
 20 25 30
 Asp Gln Asn Ser Pro Leu Leu Cys Pro Tyr Gly Leu Tyr Ala Glu Gln
 35 40 45
 Ile Ser Gly Thr Ser Phe Thr Ser Pro Arg Lys Leu Asn Gln Arg Ser
 50 55 60
 Trp Leu Tyr Arg Val Lys Pro Ser Val Thr His Glu Pro Phe Lys Pro
 65 70 75 80
 Arg Val Pro Ala His Lys Lys Leu Val Ser Glu Phe Asp Ala Ser Asn
 85 90 95
 Ser Arg Thr Asn Pro Thr Gln Leu Arg Trp Arg Pro Glu Asp Ile Pro
 100 105 110
 Asp Ser Glu Ile Asp Phe Val Asp Gly Leu Phe Thr Ile Cys Gly Ala
 115 120 125
 Gly Ser Ser Phe Leu Arg His Gly Phe Ala Ile His Met Tyr Val Ala
 130 135 140
 Asn Thr Gly Met Lys Asp Ser Ala Phe Cys Asn Ala Asp Gly Asp Phe
 145 150 155 160
 Leu Leu Val Pro Gln Thr Gly Arg Leu Trp Ile Glu Thr Glu Cys Gly
 165 170 175
 Arg Leu Leu Val Thr Pro Gly Glu Ile Ala Val Ile Pro Gln Gly Phe
 180 185 190
 Arg Phe Ser Ile Asp Leu Pro Asp Gly Lys Ser Arg Gly Tyr Val Ala
 195 200 205

122

Glu Ile Tyr Gly Ala His Phe Gln Leu Pro Asp Leu Gly Pro Ile Gly
 210 215 220
 Ala Asn Gly Leu Ala Ala Ser Arg Asp Phe Leu Ala Pro Thr Ala Trp
 225 230 235 240
 Phe Glu Asp Gly Leu Arg Pro Glu Tyr Thr Ile Val Gln Lys Phe Gly
 245 250 255
 Gly Glu Leu Phe Thr Ala Lys Gln Asp Phe Ser Pro Phe Asn Val Val
 260 265 270
 Ala Trp His Gly Asn Tyr Val Pro Tyr Lys Tyr Asp Leu Lys Lys Phe
 275 280 285
 Cys Pro Tyr Asn Thr Val Leu Leu Asp His Gly Asp Pro Ser Ile Asn
 290 295 300
 Thr Val Leu Thr Ala Pro Thr Asp Lys Pro Gly Val Ala Leu Leu Asp
 305 310 315 320
 Phe Val Ile Phe Pro Pro Arg Trp Leu Val Ala Glu His Thr Phe Arg
 325 330 335
 Pro Pro Tyr Tyr His Arg Asn Cys Met Ser Glu Phe Met Gly Leu Ile
 340 345 350
 Tyr Gly Ala Tyr Glu Ala Lys Ala Asp Gly Phe Leu Pro Gly Gly Ala
 355 360 365
 Ser Leu His Ser Cys Met Thr Pro His Gly Pro Asp Thr Thr Thr Tyr
 370 375 380
 Glu Ala Thr Ile Ala Arg Val Asn Ala Met Ala Pro Ser Lys Leu Thr
 385 390 395 400
 Gly Thr Met Ala Phe Met Phe Glu Ser Ala Leu Ile Pro Arg Val Cys
 405 410 415
 His Trp Ala Leu Glu Ser Pro Phe Leu Asp His Asp Tyr Tyr Gln Cys
 420 425 430
 Trp Ile Gly Leu Lys Ser His Phe Ser Arg Ile Ser Leu Asp Lys Thr
 435 440 445
 Asn Val Glu Ser Thr Glu Lys Glu Pro Gly Ala Ser Glu
 450 455 460

<210> 118
 <211> 815
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <220>
 <221> CDS
 <222> (37)..(705)
 <223> coding for maleylacetoacetate isomerase (MAAI)
 <400> 118
 gtaatctccg aagaagaaca aattccttgc tgaatc atg tct tat gtt acc.gat 54
 Met Ser Tyr Val Thr Asp
 1 5
 ttt tat cag gcg aag ttg aag ctc tac tct tac tgg aga agc tca tgt 102
 Phe Tyr Gln Ala Lys Leu Lys Leu Tyr Ser Tyr Trp Arg Ser Ser Cys
 10 15 20

123

gct cat cgc gtc cgt atc gcc ctc act tta aaa ggg ctt gat tat gaa 150
 Ala His Arg Val Arg Ile Ala Leu Thr Leu Lys Gly Leu Asp Tyr Glu
 25 30 35
 tat ata ccg gtt aat ttg ctc aaa ggg gat caa tcc gat tca gat ttc 198
 Tyr Ile Pro Val Asn Leu Leu Lys Gly Asp Gln Ser Asp Ser Asp Phe
 40 45 50
 aag aag atc aat cca atg ggc act gta cca gcg ctt gtt gat ggt gat 246
 Lys Lys Ile Asn Pro Met Gly Thr Val Pro Ala Leu Val Asp Gly Asp
 55 60 65 70
 gtt gtg att aat gac tct ttc gca ata ata atg tac ctg gat gat aag 294
 Val Val Ile Asn Asp Ser Phe Ala Ile Met Tyr Leu Asp Asp Lys
 75 80 85
 tat ccg gag cca ccg ctg tta cca agt gac tac cat aaa cgg gcg gta 342
 Tyr Pro Glu Pro Pro Leu Leu Pro Ser Asp Tyr His Lys Arg Ala Val
 90 95 100
 aat tac cag gcg acg agt att gtc atg tct ggt ata cag cct cat caa 390
 Asn Tyr Gln Ala Thr Ser Ile Val Met Ser Gly Ile Gln Pro His Gln
 105 110 115
 aat atg gct ctt ttt agg tat ctc gag gac aag ata aat gct gag gag 438
 Asn Met Ala Leu Phe Arg Tyr Leu Glu Asp Lys Ile Asn Ala Glu Glu
 120 125 130
 aaa act gct tgg att act aat gct atc aca aaa gga ttc aca gct ctc 486
 Lys Thr Ala Trp Ile Thr Asn Ala Ile Thr Lys Gly Phe Thr Ala Leu
 135 140 145 150
 gag aaa ctg ttg gtg agt tgc gct gga aaa tac gcg act ggt gat gaa 534
 Glu Lys Leu Leu Val Ser Cys Ala Gly Lys Tyr Ala Thr Gly Asp Glu
 155 160 165
 gtt tac ttg gct gat ctt ttc cta gca cca cag atc cac gca gca ttc 582
 Val Tyr Leu Ala Asp Leu Phe Leu Ala Pro Gln Ile His Ala Ala Phe
 170 175 180
 aac aga ttc cat att aac atg gaa cca ttc ccg act ctt gca agg ttt 630
 Asn Arg Phe His Ile Asn Met Glu Pro Phe Pro Thr Leu Ala Arg Phe
 185 190 195
 tac gag tca tac aac gaa ctg cct gca ttt caa aat gca gtc ccg gag 678
 Tyr Glu Ser Tyr Asn Glu Leu Pro Ala Phe Gln Asn Ala Val Pro Glu
 200 205 210
 aag caa cca gat act cct tcc acc atc tgattctgtg aaccgtaagc 725
 Lys Gln Pro Asp Thr Pro Ser Thr Ile
 215 220
 ttctctcagt ctcagctcaa taaaatctct taggaaacaa caacaacacc ttgaacttaa 785
 atgtatcata tgaaccagg ttacaataat 815
 <210> 119
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 119
 Met Ser Tyr Val Thr Asp Phe Tyr Gln Ala Lys Leu Lys Leu Tyr Ser
 1 5 10 15
 Tyr Trp Arg Ser Ser Cys Ala His Arg Val Arg Ile Ala Leu Thr Leu
 20 25 30

124

Lys Gly Leu Asp Tyr Glu Tyr Ile Pro Val Asn Leu Leu Lys Gly Asp
 35 40 45
 Gln Ser Asp Ser Asp Phe Lys Lys Ile Asn Pro Met Gly Thr Val Pro
 50 55 60
 Ala Leu Val Asp Gly Asp Val Val Ile Asn Asp Ser Phe Ala Ile Ile
 65 70 75 80
 Met Tyr Leu Asp Asp Lys Tyr Pro Glu Pro Pro Leu Leu Pro Ser Asp
 85 90 95
 Tyr His Lys Arg Ala Val Asn Tyr Gln Ala Thr Ser Ile Val Met Ser
 100 105 110
 Gly Ile Gln Pro His Gln Asn Met Ala Leu Phe Arg Tyr Leu Glu Asp
 115 120 125
 Lys Ile Asn Ala Glu Glu Lys Thr Ala Trp Ile Thr Asn Ala Ile Thr
 130 135 140
 Lys Gly Phe Thr Ala Leu Glu Lys Leu Leu Val Ser Cys Ala Gly Lys
 145 150 155 160
 Tyr Ala Thr Gly Asp Glu Val Tyr Leu Ala Asp Leu Phe Leu Ala Pro
 165 170 175
 Gln Ile His Ala Ala Phe Asn Arg Phe His Ile Asn Met Glu Pro Phe
 180 185 190
 Pro Thr Leu Ala Arg Phe Tyr Glu Ser Tyr Asn Glu Leu Pro Ala Phe
 195 200 205
 Gln Asn Ala Val Pro Glu Lys Gln Pro Asp Thr Pro Ser Thr Ile
 210 215 220

<210> 120
<211> 1227
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(1224)
<223> coding for fumarylacetoacetate hydrolase (FAAH)

<400> 120
atg gcg ttg ctg aag tct ttc atc gat gtt ggc tca gac tcg cac ttc 48
Met Ala Leu Leu Lys Ser Phe Ile Asp Val Gly Ser Asp Ser His Phe
 1 5 10 15
cct atc cag aat ctc cct tat ggt gtc ttc aaa ccg gaa tcg aac tca 96
Pro Ile Gln Asn Leu Pro Tyr Gly Val Phe Lys Pro Glu Ser Asn Ser
 20 25 30
act cct cgt cct gcc gtc gct atc ggc gat ttg gtt ctg gac ctc tcc 144
Thr Pro Arg Pro Ala Val Ala Ile Gly Asp Leu Val Leu Asp Leu Ser
 35 40 45
gct atc tct gaa gct ggg ctt ttc gat ggt ctg atc ctt aag gac gca 192
Ala Ile Ser Glu Ala Gly Leu Phe Asp Gly Leu Ile Leu Lys Asp Ala
 50 55 60
gat tgc ttt ctt cag cct aat ttg aat aag ttc ttg gcc atg gga cgg 240
Asp Cys Phe Leu Gln Pro Asn Leu Asn Lys Phe Leu Ala Met Gly Arg
 65 70 75 80

125

cct gcg tgg aag gaa gcg cgt tct acg ctg caa aga atc ttg tca ttt Pro Ala Trp Lys Glu Ala Arg Ser Thr Leu Gln Arg Ile Leu Ser Phe	85	90	95	288
ttg tta ttt ggc ttc aag gtt ttg gtt ttg gta tgt ttt cat gca gct Leu Leu Phe Gly Phe Lys Val Leu Val Leu Val Cys Phe His Ala Ala	100	105	110	336
aat gaa cct atc ttg cga gac aat gat gtt ttg agg aga aaa tca ttc Asn Glu Pro Ile Leu Arg Asp Asn Asp Val Leu Arg Arg Lys Ser Phe	115	120	125	384
cat cag atg agt aaa gtg gaa atg att gtt cct atg gtg att ggg gac His Gln Met Ser Lys Val Glu Met Ile Val Pro Met Val Ile Gly Asp	130	135	140	432
tat aca gac ttc ttt gca tct atg cat cac gcg aag aac tgc gga ctt Tyr Thr Asp Phe Phe Ala Ser Met His His Ala Lys Asn Cys Gly Leu	145	150	155	480
atg ttc cgt ggg cct gag aat gcg ata aac cca aat tgg ttt cgt ctt Met Phe Arg Gly Pro Glu Asn Ala Ile Asn Pro Asn Trp Phe Arg Leu	165	170	175	528
ccc att gca tat cat gga cgg gca tca tct att gtc atc tct ggg act Pro Ile Ala Tyr His Gly Arg Ala Ser Ser Ile Val Ile Ser Gly Thr	180	185	190	576
gac att att cga cca aga ggt cag ggc cat cca caa gga aac tct gaa Asp Ile Ile Arg Pro Arg Gly Gln Gly His Pro Gln Gly Asn Ser Glu	195	200	205	624
cca tat ttt gga cct tcg aag aaa ctt gat ttt gag ctt gag atg gct Pro Tyr Phe Gly Pro Ser Lys Lys Leu Asp Phe Glu Leu Glu Met Ala	210	215	220	672
gct gtg gtt ggt cca gga aat gaa ttg gga aag cct att gac gtg aat Ala Val Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gly Lys Pro Ile Asp Val Asn	225	230	235	720
aat gca gcc gat cat ata ttt ggt cta tta ctg atg aat gac tgg agt Asn Ala Ala Asp His Ile Phe Gly Leu Leu Leu Met Asn Asp Trp Ser	245	250	255	768
gct agg gat att cag gcg tgg gag tat gta cct ctt ggt cct ttc ctg Ala Arg Asp Ile Gln Ala Trp Glu Tyr Val Pro Leu Gly Pro Phe Leu	260	265	270	816
ggg aag agt ttt ggg act act ata tcc cct tgg att gtt acc ttg gat Gly Lys Ser Phe Gly Thr Thr Ile Ser Pro Trp Ile Val Thr Leu Asp	275	280	285	864
gcg ctt gag cct ttt ggt tgt caa gct ccc aag cag gat cca cct cca Ala Leu Glu Pro Phe Gly Cys Gln Ala Pro Lys Gln Asp Pro Pro Pro	290	295	300	912
ttg cca tat ttg gct gag aaa gag tct gta aat tac gat atc tcc ttg Leu Pro Tyr Leu Ala Glu Lys Glu Ser Val Asn Tyr Asp Ile Ser Leu	305	310	315	960
gag cta gca cac cat acc gtt aac ggt tgc aat ttg agg cct ggt gat Glu Leu Ala His His Thr Val Asn Gly Cys Asn Leu Arg Pro Gly Asp	325	330	335	1008
ctc ctt ggc aca gga acc ata agc gga ccg gag cca gat tca tat ggg Leu Leu Gly Thr Gly Thr Ile Ser Gly Pro Glu Pro Asp Ser Tyr Gly	340	345	350	1056

126

tgc cta ctt gag ttg aca tgg aat gga cag aaa cct cta tca ctc aat			1104
Cys Leu Leu Glu Leu Thr Trp Asn Gly Gln Lys Pro Leu Ser Leu Asn			
355	360	365	
gga aca act cag acg ttt ctc gaa gac gga gac caa gtc acc ttc tca			1152
Gly Thr Thr Gln Thr Phe Leu Glu Asp Gly Asp Gln Val Thr Phe Ser			
370	375	380	
ggt gta tgc aag gga gat ggt tac aat gtt ggg ttt gga aca tgc aca			1200
Gly Val Cys Lys Gly Asp Gly Tyr Asn Val Gly Phe Gly Thr Cys Thr			
385	390	395	400
ggg aaa att gtt cct tca ccg cct tga			1227
Gly Lys Ile Val Pro Ser Pro Pro			
405			
<210> 121			
<211> 408			
<212> PRT			
<213> Arabidopsis thaliana			
<400> 121			
Met Ala Leu Leu Lys Ser Phe Ile Asp Val Gly Ser Asp Ser His Phe			
1	5	10	15
Pro Ile Gln Asn Leu Pro Tyr Gly Val Phe Lys Pro Glu Ser Asn Ser			
20	25	30	
Thr Pro Arg Pro Ala Val Ala Ile Gly Asp Leu Val Leu Asp Leu Ser			
35	40	45	
Ala Ile Ser Glu Ala Gly Leu Phe Asp Gly Leu Ile Leu Lys Asp Ala			
50	55	60	
Asp Cys Phe Leu Gln Pro Asn Leu Asn Lys Phe Leu Ala Met Gly Arg			
65	70	75	80
Pro Ala Trp Lys Glu Ala Arg Ser Thr Leu Gln Arg Ile Leu Ser Phe			
85	90	95	
Leu Leu Phe Gly Phe Lys Val Leu Val Leu Val Cys Phe His Ala Ala			
100	105	110	
Asn Glu Pro Ile Leu Arg Asp Asn Asp Val Leu Arg Arg Lys Ser Phe			
115	120	125	
His Gln Met Ser Lys Val Glu Met Ile Val Pro Met Val Ile Gly Asp			
130	135	140	
Tyr Thr Asp Phe Phe Ala Ser Met His His Ala Lys Asn Cys Gly Leu			
145	150	155	160
Met Phe Arg Gly Pro Glu Asn Ala Ile Asn Pro Asn Trp Phe Arg Leu			
165	170	175	
Pro Ile Ala Tyr His Gly Arg Ala Ser Ser Ile Val Ile Ser Gly Thr			
180	185	190	
Asp Ile Ile Arg Pro Arg Gly Gln Gly His Pro Gln Gly Asn Ser Glu			
195	200	205	
Pro Tyr Phe Gly Pro Ser Lys Lys Leu Asp Phe Glu Leu Glu Met Ala			
210	215	220	
Ala Val Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gly Lys Pro Ile Asp Val Asn			
225	230	235	240
Asn Ala Ala Asp His Ile Phe Gly Leu Leu Met Asn Asp Trp Ser			
245	250	255	

127

Ala Arg Asp Ile Gln Ala Trp Glu Tyr Val Pro Leu Gly Pro Phe Leu
 260 265 270
 Gly Lys Ser Phe Gly Thr Thr Ile Ser Pro Trp Ile Val Thr Leu Asp
 275 280 285
 Ala Leu Glu Pro Phe Gly Cys Gln Ala Pro Lys Gln Asp Pro Pro Pro
 290 295 300
 Leu Pro Tyr Leu Ala Glu Lys Glu Ser Val Asn Tyr Asp Ile Ser Leu
 305 310 315 320
 Glu Leu Ala His His Thr Val Asn Gly Cys Asn Leu Arg Pro Gly Asp
 325 330 335
 Leu Leu Gly Thr Gly Thr Ile Ser Gly Pro Glu Pro Asp Ser Tyr Gly
 340 345 350
 Cys Leu Leu Glu Leu Thr Trp Asn Gly Gln Lys Pro Leu Ser Leu Asn
 355 360 365
 Gly Thr Thr Gln Thr Phe Leu Glu Asp Gly Asp Gln Val Thr Phe Ser
 370 375 380
 Gly Val Cys Lys Gly Asp Gly Tyr Asn Val Gly Phe Gly Thr Cys Thr
 385 390 395 400
 Gly Lys Ile Val Pro Ser Pro Pro
 405

<210> 122
 <211> 11667
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: suppression
 construct 2 p3300.1-Toc159-GFP-RNAi
 <400> 122
 aattcgtttc tccataataa tgtgtgagta gttcccagat aaggaaatta gggttcctat 60
 agggtttgc tcatgtgttg agcatataag aaacccttag tatgtatttg tatttgtaaa 120
 atacttctat caataaaatt tctaattctt aaaaccaaaa tccagtacta aaatccagat 180
 cccccgaatt aattcggcgt taattcagca attcgtaaatc atggtcatacg ctgtttcctg 240
 tgtgaaattt ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccgaaagc ataaagtgtt 300
 aaggcttgggg tgcctaataa gtgagctaac tcacattaat tgcgttgcgc tcactgccc 360
 ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcatataatg aatcgccaa cgccgggg 420
 gaggcgggtt gcgtattggc tagagcagct tgccaacatg gtggagcacg acactctcg 480
 ctactccaaat aatatcaaag atacagtctc agaagaccaa agggctattt agactttca 540
 acaaagggtt atatcggaa acctcctcgg attccattgc ccagctatct gtcacttc 600
 caaaaaggaca gtagaaaaagg aagggtggcac ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa 660
 ggctatcggtt caagatgcct ctggccacag tggcccaaaa gatggacccc caccacgag 720
 gagcatcggtt gaaaaagaag acgttccaaac cacgtttca aagcaagtgg attgatgtga 780
 taacatgggtt gagcacgaca ctctcgctca ctccaagaat atcaaagata cagtctcaga 840
 agacccaaagg gctattgaga cttttcaaca aagggttaata tcgggaaacc tcctcggtt 900
 ccattgcccc gctatctgtc acttcatcaa aaggacagta gaaaagaag gtggcaccta 960
 caaatgccccat cattgcata aaggaaaggc tatcggttcaa gatgcctctg ccgacagtgg 1020
 tcccaaaagat ggaccccccac ccacgaggag catcggttcaa aaagaagacg ttccaaaccac 1080
 gtcttcaaag caagtggatt gatgtgatat ctccactgac gtaaggatg acgcacaatc 1140
 ccactatcct tcgcaagacc ttccctata taaggaagtt catttcattt ggagaggaca 1200
 cgctgaaatc accagtctct ctctacaaat ctatctctc cgagtctacc atgagcccag 1260
 aacgacgccc ggccgacatc cgccgtgcca ccgaggcgga catgcccgcg gtctgcacca 1320
 tcgtcaacca ctacatcgag acaagcacgg tcaacttccg taccgagccg caggaaccgc 1380

aggagtggac ggacgacacc tcggctgtc gggagcgcta tccctggctc gtgcggagg 1440
 tggacggca ggtcgccggc atccctacg cggccccctg gaaggcacgc aacgcctacg 1500
 actggacggc cgagtcgacc gtgtacgtct ccccccggca ccagcgacg ggactgggct 1560
 ccacgctcta accccacccg ctgaagtccc tggaggcaca gggcttaag agcgtggtcg 1620
 ctgtcatcg gctgccaaac gaccggacg tgccatgca cgaggcgctc ggatatgccc 1680
 ccccgccat gctcgccggc gccggcttca agcacgggaa ctggcatgac gtgggtttct 1740
 ggcagctgga cttagccctg ccggtaccgc cccgtccggc cctgcccgtc accgagatt 1800
 gactcgagtt tctccataat aatgtgtgag tagtcccgag ataaggaaat tagggttcc 1860
 atagggttc gctcatgtgt tgagcatata agaaaccctt agtatgtatt tgatttgta 1920
 aaatacttct atcaataaaaa ttcttaattc ctaaaaccaa aatccagttac taaaatccag 1980
 atcccccgaa ttaattcgcc gtttaattcag tacattaaaa acgtccgcaaa tgggttatta 2040
 agttgtctaa gcgtcaattt gtttacacca caatatatcc tgccaccagg cagccaacag 2100
 ctcccccggacc ggcagctcg cacaatca ccactcgata caggcagccc atcagtcgg 2160
 gacggcgtca gccccggagac cgttgttaagg cggcagactt tgctcatgtt accgatgcta 2220
 ttccggaaagaa cggcaactaa gctgcccggggt ttggaaacacg gatgatctcg cggagggtag 2280
 catgttgatt gtaacgatga cagagcgttgc ctggctgtga tcaccgcgtt ttccaaatcg 2340
 gctccgtcga tactatgtta tacgccaact ttggaaaccaa ctttgaaaaaa gctgtttct 2400
 ggtatttaag gttttagaat gcaaggaaaca gtgaatttggg gttcgtcttgc ttataattag 2460
 cttcttgggg tatctttaaa tactgttagaa aagaggaagg aaataataaa tggctaaaat 2520
 gagaatatca ccggaaattga aaaaactgtat cggaaaataac cgctgcgtaa aagataccgga 2580
 aggaatgtct cctgctaagg tatataagct ggtggggagaa aatgaaaacc tatattttaa 2640
 aatgacggac agccggataa aagggacac ctatgtatgtg gaacggaaaa agacatgtat 2700
 gctatggctg gaagaaaagc tgcctgttcc aaagggtctg cactttaac ggcattatgg 2760
 ctggagcaat ctgctcatga gtgaggccga tggcgttcc tgctcggaaag agtatgaaga 2820
 tgaacaaagc cctgaaaaga ttatcgagct gtatgcggag tgcatcaggc tcttcactc 2880
 catcgacata tcggattgtc cctatacgaa tagcttagac agccgcttag ccgaatttgg 2940
 ttacttactg aataacgatc tggccgtat ggtttgcgaa aactggaaag aagacactcc 3000
 attttaagat ccgcgcgagc tttatcgat tttaaagacg gaaaagcccg aagaggaact 3060
 tgtctttcc cacggcgacc tgggagacag caacatctt gtgaaagatg gcaaagtaag 3120
 tggctttatt gatcttggga gaagcgccag ggccgacaag tggatgaca ttgccttctg 3180
 cgtccggctg atcaggggagg atatcgggga agaacagtat gtcgagctat tttttactt 3240
 actggggatc aagcctgatt gggagaaaat aaaatattat attttactgg atgaattgtt 3300
 ttagtaccta gaatgcatga cccaaatccc ttaacgttag ttttcgttcc actgagcg 3360
 agaccccgta gaaaagatca aaggatctt ttgagatctt tttttctgc gctaatctg 3420
 ctgcttgc当地 aaaaaaaaaac caccgctacc agcgggtggg tttttccggg atcaagagct 3480
 accaactt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtct 3540
 tctagtgttag ccgttagttt gcccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacataacct 3600
 cgcctctgta atccctgttac cagtggtgc tgccagtggc gataagtctgt gtcttaccgg 3660
 gttggactca agacatgtat taccggatata ggcgcagcgcc tccggctgaa cgggggttcc 3720
 gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcg 3780
 gctatgagaa agcggccacgc tcccgaaagg gagaaggcg gacaggtatc cggtaaagcgg 3840
 cagggtcgaa acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg gaaaacgcct ggtatcttta 3900
 tagtcctgtc gggtttgc当地 acctctgact tgacgtcgat tttttgtat gctcgtcagg 3960
 ggggcggagc ctatggaaaaa acgcccggccaa cggccctt ttacgggtcc tggcctttt 4020
 ctggcctttt gctcacatgt tctttctgc gttatcccct gattctgtgg ataaaccgtat 4080
 taccgcctt gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc 4140
 agtgagcgag gaagcggaag agcgcctgtat gcggtat ttttctcgtac atctgtgcgg 4200
 tatttcacac cgcatatggt gcactctcag tacaatctgc tctgatgccg catagttaaag 4260
 ccagtataca ctccgctatc gctacgtgac tgggtcatgg ctgcggccccc acacccggca 4320
 acaccccgctg acgcggccctg acgggctgt ctgcgtcccg catccgctta cagacaagct 4380
 gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggtttcac cgtcatcacc gaaacgcggc 4440
 aggccagggtg cttgtatgtg ggcgcggcgc gtcgagtgcc gacggcgcgg ctgtccggc 4500
 ccctggtaga ttgcctggcc gtagggccagc catttttag gggccagcgg ccgcgtatagg 4560
 ccgacgcgaa gccccggggc gtagggagcg cagcggaccga agggtaggccc cttttgcag 4620
 ctcttcggct gtgcgtggc cagacagttac tgacaggcc aggcgggttt taagagttt 4680
 aataagttt aaagagttt aggcggaaaa atgcctttt ttctctttta tattcgtcac 4740
 ttacatgtgt gaccgggtcc caatgtacgg cttgggttc ccaatgtacg gttccgggtt 4800

cccaatgtac ggcttgggt tcccaatgt a cgtgctatcc acaggaaaga gacctttcg 4860
 accttttcc cctgctaggg caatttgcgc tagcatctgc tccgtacatt aggaaccggc 4920
 ggatgcttcg ccctcgatca gggtgcgta gcgcgtact aggtatcggt cagcctgccc 4980
 cgcctccctcc ttcaaatact aactccggcag gtcatttgc acgtatcgatc tgccacgg 5040
 gaaacagaac ttcttgaact ctccggcgt gcccactgcgt tcgttagatcg tcttgaacaa 5100
 ccatctggct tctgccttgc ctgcggcgcg gcgtgccagg cggtagagaa aacggccgat 5160
 gcccggatcg atcaaaaagt aatcgggtg aaccgtcagc acgtccgggt tcttgccttc 5220
 tgtgatctcg cggtacatcc aatcagctag ctgcgtatcg atgtactccg gccgccccgt 5280
 ttcgctctt acgtatctgt agcggctaat caaggcttca ccctcgata ccgtcaccag 5340
 gccggccgttc ttggccttct tcgtacgtg catggcaacg tgcgtgggt ttaaccgaat 5400
 gcagggttct accaggtcg tttctgtt tccgcctatcg gtcgcggc agaacttgag 5460
 tacgtccgca acgtgtggac ggaacacgcg gccgggcttgc ttccttcc cttcccgta 5520
 tcggttcatg gattcggtt gatgggaaac cgcctatcg accaggtcgta aatcccacac 5580
 actggccatg ccggccggcc ctgcggaaac ctctacgtgc ccgtctggaa gtcgttagcg 5640
 gatcacctcg ccagctcgcc ggtcaccgtt cgacagacgg aaaacggcca cgtccatgtat 5700
 gtcgcacta tcgcgggtgc ccacgtcata gagcatcgga acgaaaaaat ctgggtgctc 5760
 gtcgccttgc ggcgcgttcc taatcgacgg cgacccggct gccggcggtt gccgggattc 5820
 tttgcggatt cgatcagcg ccgcttgcgca cgattcaccg gggcgtgctt ctgcctcgat 5880
 gcggttgcgc tggcgggcct ggcgggcctt caacttctcc attaggtcat caccacgcg 5940
 cgccgcgatt tgcgttgcgc cggatgggtt ggcggcgtca cgccgattcc tcgggcttgg 6000
 ggggttccagt gccattgcag ggccggcaga caacccagcc gcttacgcct ggccaaccgc 6060
 ccgttccctcc acacatgggg cattccacgg cgtcggtgcc tgggttctt tgatttcca 6120
 tgccgcctcc tttagccgtt aaaaattcatc tactcattta ttcatgttcatcattactct 6180
 ggtagctcg cgtatgtattc agatagcagc tcggtatgg tcttgccttgc gcttaccgcg 6240
 tacatcttca gcttgggtgt atccctccgc ggcaactgaa agttgaccgc cttcatggct 6300
 ggcgtgtctg ccaggctggc caacgttgcg gccttgcgtc tgctgtcgatc cggacggccg 6360
 gcaacttagcg ttttgcgtt tttgcatttcatc ttctctttac ctcattaact caaatgagtt 6420
 ttgatattat ttcaagcggcc agcgccttgc cctcgcgggc agcgtcgccc tcgggttctg 6480
 attcaagaac gtttgtgcgc gcccggcag tgcttgcgtt gtcacgcgc tgctgtatac 6540
 gggactcaag aatgggcagc tcgtacccgg ccagcgccgc ggcaacctca cggccgatgc 6600
 gcggtcctt gatcgcccgc gacacgacaa aggccgcttgc tagccttcca tccgtgacct 6660
 caatgcgtcg cttaaccagc tccaccaggt cggcgggtggc ccatatgtcg taagggtctg 6720
 gctgcacccgg aatcagcagc aagtgcgttgc cttgtatcg ggcacacagcc aagtccgcgc 6780
 cctggggcgc tccgtcgatc actacgaatgc cgcgcggcc gatggccttc acgtcgccgt 6840
 caatcgtcg gcggtcgatc cgcacaacgg ttagcggttgc atcttcccgc acggccgccc 6900
 aatcgcggc actgccttgc ggtatcgaaat cgactaacag aacatcgcc cggcgcagtt 6960
 gcaggcgcgc ggctagatgg tttgcgttgc tgacccgcct ttctggtaa 7020
 gtacagcgat aacccatcg cgttcccctt gcgtatgtt ttatattactc atcgcatcat 7080
 atacgcagcg accgcgtatc gcaagctgtt ttactcaat acacatcacc ttttttagacg 7140
 gccggcgtcg gtttcttcgc cggccaaatgc ggcggccag gccgcgcagct tggcatcaga 7200
 caaaccggcc aggatttcat gcagccgcac gggttgcgttgc tgccggcgc gctcgaacac 7260
 gtacccggcc gcgatcatct cgcgcgtatc ctttcggttgc atgaaaaacgc gttcgtcctg 7320
 gccgtccttgc tgctgttgc tcttggcgtt cattctcgcc ggcggccagg 7380
 gctgcggcct cggtaatgc gtcctcacgg aaggcaccgc gccgcctggc ctcgggtggc 7440
 gtcacttctt cgcgtcgatc aagtgcgttgc tacagggtcg agcgtatgcac gccaaggcgt 7500
 gcagccgcct ctttacggcgtt gcccgccttgc tggtcgatca gtcgcgggc gtgcgcgtatc 7560
 tgtgcggggg tgagggtagg gcccggggccaa aacttacgcg ctcgggcctt ggcggcctcg 7620
 cggccgcgtcc ggggtcgatc gatgattagg gaacgcgtca actcggcaat gcccggcgtac 7680
 acggtaaca ccatgcggcc ggcggcgttgc tggtgtcgccc cccacggcgc tgccaggcta 7740
 cgcaggcccg cgcggccctc ctggatgcgc tcggcaatgt ccagtaggtc gcccgggtcg 7800
 cggggccaggc ggtcttagcct ggtcaactgc acaacgtcg cagggcgttag gtggtaa 7860
 atccctggcca gtcgcggccg gtcgcgccttgc tgccgggttgc tcttctcgaa aaacagcttgc 7920
 gtgcagccgg cgcgtcgatc ttccggccgt tggttgcgttgc agtccctggc gtcgggtcg 7980
 acgcggccat agccacgcg gcccacgcg ggcgttgcgttgc tcatggcgta atgtctccgg 8040
 ttcttagtcgc aagtattcttca ctttatgcgttgc ctaaaacacg cgacaagaaaa acggccaggaa 8100
 aagggcaggc cggcagccgt tgcgtacttgc taggacttgc ggcacatgtc gttttcagaa 8160
 gacggcgtca ctgaacgtca gaagccgact gcactatagc agcggagggg ttggatcaaa 8220

gtactttgat cccgagggga accctgtggt tggcatgcac atacaatgg acgaacggat 8280
aaacctttc acgcctttt aaatatccgt tattctaata aacgctctt tctcttaggt 8340
ttacccgcca atatatcctg tcaaacadgt atagttaaa ctgaaggcg gaaacgacaa 8400
tctgatccaa gctcaagctg ctctagcatt cgccattcag gctgcgcaac tggggaaag 8460
ggcgatcggt gcgggcctct tcgcttattac gccagctggc gaaagggga tggctgca 8520
ggcgatcggt ttggtaacg ccagggttt cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca 8580
gtgccaagct tttggctaga gcagctgcc aacatgggg agcacgacac tctcgctac 8640
tccaagaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg ctattgagac tttcaacaa 8700
aggtaatac cggaaaacct cctcgattc cattgcccag ctatctgtca cttcatcaaa 8760
aggacagttag aaaaggaagg tggcacctac aaatgccatc attgcgataa agggaaaggct 8820
atcggtcaag atgcctctgc cgacagtggt cccaaagatg gaccccccacc cacgaggagc 8880
atcggtggaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaaagc aagtggattt atgtgataac 8940
atgggtggagc acgacactct cgtctactcc aagaatatac aagatacagt ctcaagagc 9000
caaaggccta ttgagacttt tcaacaaagg gtaatatcgg gaaacccctt cggattccat 9060
tgcccagcta tctgtcactt catcaaaaagg acagtagaaaa aggaagggtt cacccacaaa 9120
tgccatcatt gcgataaaagg aaaggctatc gttcaagatg cctctgcga cagtggccc 9180
aaagatggac cccccccac gaggagcatc gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct 9240
tcaaagcaag tggattgtat tgatatctcc actgacgtaa gggatgacgc acaatcccac 9300
tatccttcgc aagaccccttcc tctatataag gaagttcatt tcatttgag aggacacgct 9360
gaaaatcacca gtcttotctt acaaattctat ctctccatgg catgttctgc aggtcgactc 9420
tagaggatcc cccgggtaccg agctcgaaga tcttcgacgt cggatttcat ggactcaaaag 9480
tcggttactc cagaaccaac caacccttc tacgcttcc cggggcaatc agggaaaaacc 9540
tatgcttctg ttgtccgc cgtctgtctt gcagccgcg ataaggagga tgggtgtct 9600
gtgagtagtg ccaaggagtt ggattcctca tcggaggctg tgtctggtaa ttggataag 9660
gttggagctg atgatttattc tgactccgag aaggagaagc cgaatttggt gggatgggg 9720
aaggttccg acgaggttgg aagggttcc aaggaggatt ctactactcc tgaggctact 9780
ccgaaggcctg aggtggtttc ttgtgagaca attgtgttag atgatgttcc atcggttatct 9840
ccgaaggccgg aggctgtttc tgatgggtgtt ggggttggg aggagaataa gaaggtaag 9900
gaggacgtgg aggatattaa agacgttgtt gagagtaaga ttggaaatgg gaggttggat 9960
gttggatgtga aacaggttcc cacagatggg gagagtgaga aagcttccaa cacttgcac 10020
tactttctct tatgggttcc aatgctttc aagataccca gatcatatga aacggcatga 10080
cttcttcaga agcgccatgc ctgagggata cgtcaggag aggaccatct tcttcaga 10140
cgacggaaac tacaagacac gtgctgaagt caagtttgcgg gggacacccc tcgtcaacag 10200
gatcgagctt aaggaaatcg atttcaagga ggacggaaac atcctcgccca acaagtttgg 10260
atacaactac aactccaca acgtatacat catggccac aagcaaaaga acggcatcaa 10320
agccaacttc aagacccgccc acaacatcga agacggccgc gtgcaactcg ctgatcatta 10380
tcaacaaaat actccatttgcgatggccc tgccttttccagacaacc attacctgtc 10440
cacacaatct gccccttcga aagatcccac cgaaaagaga gaccacatgg tccttcttga 10500
gtttgttaca gctgctggga ttacacatgg catggatgaa ctatacaaac atgatgagct 10560
ttaaggatcc ttaaagctca tcatgtttt atagttcatc catgcatgt gtaatccag 10620
cagctgttac aaactcaaga aggaccatgt ggtctctttt ttcgggtggg tctttcgaaa 10680
ggcagattt gttggacagg taatgggtt ctggtaaaag gacagggccca tcgccaattt 10740
gagtattttt ttgataatga tcaagcgagg gcacggccgc gtctcgatg ttgtgggg 10800
tcttgaagtt ggcttgcgtt ccgttctttt gcttgcgc catgatgtat acgttgggg 10860
agttgttagt gtattccaaat ttgtggccga ggtatgttcc gtcctccttga aaatcgattc 10920
ccttaagctc gatccgttg acgagggtgtt ctccctcaaa cttgacttca gcacgtgtct 10980
tgttagttcc gtcgtccttgc aagaagatgg tcctctcctg cacgtatccc tcaggcatgg 11040
cgctcttgcgaa gaagtcatgc cggttcatat gatctggta tcttggaaatgg cattgaacac 11100
cataagagaa agtagtgaca agtggggaa gcttctcac tctccccatc tggaaagcc 11160
tgtttacat caacatcaac actcccatatt tcaatcttac tctcaccatc gtcttataa 11220
tcctccacgt cctccatttac cttcttatttc tcctccacaa cccctacacc atcagaaaca 11280
gcctccggct tcggagataa cgatgaaaaca tcatctacac caattgtctc accagaaacc 11340
acctcaggct tcggagtagc ctcaggatgtt gtagaatttcc cttttaaaga accatccacc 11400
tcgtcgaaa cttccatc acccaccataa ttcggttctt cttctcgga gtcagataaa 11460
tcatcagctc caacccatttca cgaattacca gacacagcct ccgtgagga atccaaactcc 11520
ttggactac tcacagcacc accatcccttcc ttatcgccg ctcagcagc acggccgg 11580

131

acaacagaag cataggaaaa tcctgattgc cccgaagaag cgtagaaggg gttggttgg 11640
tctggagtaa ccgactttga gtccatg 11667

<210> 123

<211> 36

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 123

ctcgaggaat tcatggactc aaagtcggtt actcca

36

<210> 124

<211> 40

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 124

ggatccataaa gcaagctttc tcactctccc catctgtgga

40

<210> 125

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 125

aagcttccaa cacttgtcac tacttt

26

<210> 126

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 126

ggatccttaa agctcatcat gtttgt

26